

PLANT RESISTANT TO ENVIRONMENTAL STRESS

Patent Number: JP2000116260
Publication date: 2000-04-25
Inventor(s): SHINOZAKI KAZUKO;; KASUGA YOSHIE
Applicant(s): JAPAN INTERNATIONAL RES CENTER FOR AGRICULTURAL SCIENCES;; BIO ORIENTED TECHNOL
RES ADVANCEMENT INST
Requested Patent: ☐ JP2000116260
Application
Number: JP19980292348 19981014
Priority Number
(s):
IPC Classification: A01H5/00; C07K14/415; C12N15/09
EC Classification:
Equivalents: JP3178672B2

Abstract

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject plant with improved resistance to environmental stresses, e.g. those caused by drought, cold weather and salt, without being stunted, by including a gene with a DNA, to which a gene coding for a specific transcription factor is connected, in a stress-responsive promoter.

SOLUTION: This plant is a transgenic one, with a DNA connected to a stress-responsive promoter (e.g. γ d29A gene promoter), the DNA having an amino acid sequence (e.g. that shown by the formula) and coding for a transcription factor (e.g. DREB1 protein), wherein the transcription factor is connected to the stress-responsive promoter, and can activate transcription of the gene coding for the transcription factor. It is preferable to produce the transgenic plant by introducing a DAN, to which the gene coding for the transcription factor is connected, in the stress-responsive promoter.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2000-116260
(P2000-116260A)

(43)公開日 平成12年4月25日(2000.4.25)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
A 0 1 H 5/00		A 0 1 H 5/00	A 2 B 0 3 0
C 0 7 K 14/415		C 0 7 K 14/415	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 H 0 4 5

審査請求 有 請求項の数 8 O L (全 36 頁)

(21)出願番号 特願平10-292348

(22)出願日 平成10年10月14日(1998.10.14)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成10年5月5日
日本植物生理学会開催の「1998年度日本植物生理学会年
会」において文書をもって発表

(71)出願人 591286568

農林水産省国際農林水産業研究センター所
長

茨城県つくば市大わし1-2

(71)出願人 000195568

生物系特定産業技術研究推進機構

埼玉県大宮市日進町1丁目40番地2

(72)発明者 篠崎 和子

茨城県稲敷郡基崎町高見原2-4-15

(72)発明者 春日 美江

茨城県つくば市並木2-14-301-501

(74)代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 環境ストレス耐性植物

(57)【要約】

【課題】 環境ストレス耐性植物

【解決手段】 ストレス応答性プロモーターの下流に以
下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNAが連結さ
れた遺伝子を含むトランスジェニック植物の提供。

(a) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8
若しくは配列番号10で表されるアミノ酸配列からなるタ
ンパク質

(b) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8
若しくは配列番号10で表されるアミノ酸配列において少
なくとも1個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加され
たアミノ酸配列からなり、かつストレス応答性エレメン
ト下流の遺伝子の転写を制御するタンパク質

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ストレス応答性プロモーターの下流に以下の (a) 又は (b) のタンパク質をコードする DNA が連結された遺伝子を含むトランスジェニック植物。

(a) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8 若しくは配列番号 10 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8 若しくは配列番号 10 で表されるアミノ酸配列において少なくとも 1 個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつストレス応答性エレメント下流の遺伝子の転写を制御するタンパク質

【請求項 2】 ストレス応答性プロモーターの下流に以下の (c) 又は (d) の DNA が連結された遺伝子を含むトランスジェニック植物。

(c) 配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7 若しくは配列番号 9 で表される塩基配列からなる DNA

(d) 配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7 若しくは配列番号 9 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつストレス応答性エレメント下流の遺伝子の転写を制御するタンパク質をコードする DNA

【請求項 3】 ストレスが乾燥ストレス、低温ストレス又は塩ストレスである請求項 1 又は 2 記載のトランスジェニック植物。

【請求項 4】 ストレス応答性プロモーターが、rd29A 遺伝子プロモーター、rd29B 遺伝子プロモーター、rd17 遺伝子プロモーター、rd22 遺伝子プロモーター、DREB1A 遺伝子プロモーター、cor6.6 遺伝子プロモーター、cor15a 遺伝子プロモーター、erd1 遺伝子プロモーター及び kin1 遺伝子プロモーターからなる群から選択される少なくとも 1 つである請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック植物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、乾燥ストレス応答性エレメント (DRE; dehydration responsive element) に結合し DRE 下流の遺伝子の転写を制御するタンパク質をコードする DNA を、ストレス応答性プロモーター下流に連結した遺伝子が導入されたトランスジェニック植物に関する。

【0002】

【従来の技術】植物は、自然界において、乾燥、高温、低温又は塩などの様々な環境ストレスに曝されて生息している。植物は、動物のように移動によってストレスから身を守る行動をとることができないため、進化の過程で、様々なストレス耐性機構を獲得してきた。例えば、低温耐性植物 (シロイヌナズナ、ホウレンソウ、レタス、エンドウ、オオムギ、テンサイなど) は、低温感受性植物 (トウモロコシ、イネ、カボチャ、キュウリ、バ

ナナ、トマトなど) よりも、生体膜脂質中の不飽和脂肪酸の含有割合が低く、そのため、低温に曝されても、生体膜脂質の相転移が起こりにくく、低温障害が生じにくい。

【0003】これまで、人為的に環境ストレス耐性植物を作出する場合、乾燥、低温又は塩耐性な系統の選抜や交配などの手法が用いられてきたが、選抜法には多くの時間が必要であり、一方、交配法は限られた種間にしか用いることができないため、高い環境ストレス耐性を有する植物の作出は困難であった。

【0004】近年のバイオテクノロジーの進歩に伴い、植物に異種生物由来の特定の遺伝子を導入するトランスジェニック技術などの手法を用いて、乾燥、低温、塩などに耐性の植物の作出が試みられている。これまでに、環境ストレス耐性植物の作出に用いられた遺伝子としては、浸透圧調節物質 (マンニトール、プロリン、グリシンベタインなど) の合成酵素遺伝子や細胞膜脂質の修飾酵素遺伝子などが挙げられる。具体的には、マンニトール合成酵素遺伝子としては大腸菌由来マンニトール 1-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 [Science 259:508-510 (1993)]、プロリン合成酵素遺伝子としては豆由来 Δ¹-プロリン-5-カルボキシレートシンターゼ遺伝子 [Plant Physiol. 108:1387-1394 (1995)]、グリシンベタイン合成酵素遺伝子としては細菌由来コリンデヒドロゲナーゼ遺伝子 [Plant J. 12:1334-1342 (1997)]、細胞膜脂質修飾遺伝子としてはシロイヌナズナ由来 ω-3 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子 [Plant Physiol. 105:601-605 (1994)] やラン藻の Δ⁹ 不飽和化酵素遺伝子 [Nature Biotech. 14:1003-1006 (1996)] が用いられている。しかし、これらの遺伝子の導入植物は、ストレス耐性度が不安定であったり、耐性レベルが低い等の問題から実用化に至ったものは存在しない。

【0005】さらに、乾燥、低温、又は塩ストレス耐性の獲得には、複数の遺伝子が働き、その結果、植物はストレス耐性になることが報告されている [Plant Physiol. 115:327-334 (1997)]。そこで、ストレス耐性の獲得に関与する複数の遺伝子の発現を同時に活性化することができる転写因子をコードする遺伝子が植物に導入され、ストレス耐性度の高い植物が作出されている [The Plant Cell, 10:1-17 (1998)]。しかし、このように複数の遺伝子の発現を誘導する遺伝子を導入した場合、複数の遺伝子が同時期に活性化されるため、宿主植物のエネルギーは、該遺伝子産物の生成や、該遺伝子産物に起因する細胞内代謝に向けられ、宿主植物は、成長が遅れたり矮化してしまうことが多い。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、ストレス応答性プロモーターの下流に、ストレス応答性エレメントに結合し該エレメント下流の遺伝子の転写を制御するタンパク質をコードする DNA が連結された遺伝子を含む、

環境ストレス(乾燥ストレス、低温ストレス、塩ストレスなど)に対する耐性が向上し且つ矮化の起こらないトランスジェニック植物を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、乾燥、低温又は塩ストレス耐性の獲得に働く遺伝子を制御する新規な転写因子の遺伝子をクローニングし、植物にストレス応答性プロモーターの下流に連結した該遺伝子を導入することにより、乾燥、低温又は塩ストレス耐性が著しく向上し且つ矮化の起こらない植物を作出することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0008】すなわち、本発明は、ストレス応答性プロモーターの下流に以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNAが連結された遺伝子を含むトランスジェニック植物である。

(a) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8若しくは配列番号10で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8若しくは配列番号10で表されるアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつストレス応答性エレメント下流の遺伝子の転写を制御するタンパク質

【0009】さらに、本発明は、ストレス応答性プロモーターの下流に以下の(c)又は(d)のDNAが連結された遺伝子を含むトランスジェニック植物である。

(c) 配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7若しくは配列番号9で表される塩基配列からなるDNA

(d) 配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7若しくは配列番号9で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつストレス応答性エレメント下流の遺伝子の転写を制御するタンパク質をコードするDNA

ストレスとしては、乾燥ストレス、低温ストレス又は塩ストレスが挙げられる。

【0010】さらに、ストレス応答性プロモーターとしては、rd29A遺伝子プロモーター、rd29B遺伝子プロモーター、rd17遺伝子プロモーター、rd22遺伝子プロモーター、DREB1A遺伝子プロモーター、cor6.6遺伝子プロモーター、cor15a遺伝子プロモーター、erd1遺伝子プロモーター及びkin1遺伝子プロモーターからなる群から選択される少なくとも1つが挙げられる。以下、本発明を詳細に説明する。

【0011】

【発明の実施の形態】本発明のトランスジェニック植物は、ストレス応答性プロモーターの下流に乾燥ストレス応答性エレメント(DRE; dehydration responsive element)に結合しDRE下流の遺伝子の転写を活性化する機能を有する転写因子をコードするDNA(DREB遺伝子という)が連結された遺伝子を導入することにより作出した、環境

ストレス耐性のトランスジェニック植物である。

【0012】本発明において用いられるDREB遺伝子は、以下のようにしてクローニングすることができる。なお、DREB遺伝子のうち、DRE結合タンパク質1A遺伝子をDREB1A遺伝子、DRE結合タンパク質1B遺伝子をDREB1B遺伝子、DRE結合タンパク質1C遺伝子をDREB1C遺伝子、DRE結合タンパク質2A遺伝子をDREB2A遺伝子、DRE結合タンパク質2B遺伝子をDREB2B遺伝子という。

【0013】1. DREB遺伝子のクローニング

(1) シロイヌナズナのmRNA及びcDNAライブラリーの調製
mRNAの供給源としては、シロイヌナズナの葉、茎、根、花など植物体の一部又は植物体全体が挙げられる。また、シロイヌナズナの種子をGM培地、MS培地、#3培地などの固体培地に播種し、無菌条件下で生育させた植物体も用いることができる。DREB1A遺伝子のシロイヌナズナ植物体中のmRNAレベルは、植物体を低温ストレス(例えば、10〜-4℃)に曝露することにより増大し、DREB2A遺伝子のmRNAレベルは、植物体を塩ストレス(例えば、150〜250mM NaCl)や乾燥ストレス(例えば、脱水状態にする)に曝露することにより増大するため、シロイヌナズナをこれらのストレスに曝露させた植物体を用いてもよい。

【0014】mRNAの調製は、例えば、GM培地で生育させたシロイヌナズナの植物体を、上記乾燥ストレス、低温ストレス又は塩ストレスに曝露後、液体窒素で凍結する。その後は、通常行われる手法により行うことができる。例えば、凍結した植物体を乳鉢などで摩砕後、得られた摩砕物から、グリオキザール法、グアニジンチオシアネート-塩化セシウム法、塩化リチウム-尿素法、プロテイナーゼK-デオキシリボヌクレアーゼ法などにより粗RNA画分を抽出調製する。次いで、この粗RNA画分から、オリゴdT-セルロースやセファロース2Bを担体とするポリ U-セファロースなどを用いたアフィニティーカラム法、あるいはパッチ法によりポリ(A)⁺RNA(mRNA)を得ることができる。さらに、ショ糖密度勾配遠心法などによりmRNAをさらに分画してもよい。

【0015】このようにして得られたmRNAを鋳型として、市販のキット(例えば、ZAP-cDNASynthesis Kit(STRATAGENE社製))を用い、オリゴdT₂₀及び逆転写酵素によって一本鎖cDNAを合成した後、該一本鎖cDNAから二本鎖cDNAを合成する。次いで、得られた二本鎖cDNAにEcoRI-NotI-BamHIアダプターなどの適切なアダプターを付加後、転写活性化ドメイン(例えばGAL4活性化ドメインなど)を含むプラスミド(例えばpAD-GAL4プラスミド(Stratagene社製)など)の転写活性化ドメインの下流に連結することにより、cDNAライブラリーを作製することができる。

【0016】(2) DREB遺伝子のクローニング用宿主
DREB遺伝子をクローニングする方法としては、酵母を用いるワンハイブリッドスクリーニング法を挙げることが

できる。該スクリーニング法によるスクリーニングは、市販のキット(例えばMATCHMAKERワンハイブリッドシステム(Clontech社製))を用いて行うことができる。

【0017】上記キットを用いて、DREB遺伝子をクローニングする場合、DREB遺伝子がコードするタンパク質(DREBタンパク質という)が結合するDREを含むDNA断片をキットに添付のプラスミドpHISi-1及びpLacZiに連結し、得られたプラスミドをキットに添付の酵母(*Saccharomyces cerevisiae* YM4271)に形質転換したクローニング用宿主酵母を作製することが必要である。

【0018】クローニング用宿主酵母は、HIS3最小プロモーターと呼ばれるプロモーターの作用でリーキー(leaky)に発現されるHIS3タンパク質の作用によりヒスチジンを生合成することができるため、通常はヒスチジン非存在下でも生育可能である。しかし、ここでHIS3タンパク質をコードする遺伝子の発現に用いられているプロモーターは最低限の転写水準しか維持することのできない最小プロモーターであるため、細胞内に生成されるタンパク質は非常に微量である。従って、HIS3タンパク質の競合阻害剤である3-AT(3-アミノトリアゾール)存在下で前記宿主酵母を培養した場合、細胞内のHIS3タンパク質の機能は、濃度依存的に3-ATによって阻害され、ある濃度以上の3-AT存在下では、細胞内のHIS3タンパク質は機能することができなくなり、前記宿主酵母はヒスチジン非存在下で生育不能となる。同様に、lacZ遺伝子も、CYC1最小プロモーターと呼ばれる最小プロモーターの下流に存在し、細胞内に生成されるβ-ガラクトシダーゼは非常に微量である。従って、前記宿主酵母をX-gal含有プレートに播種した場合、出現したコロニーは、コロニー全体が青色になるほどのX-gal分解能は有さない。

【0019】しかし、前記宿主酵母中において、HIS3遺伝子上流のDRE及びlacZ遺伝子上流のDREに結合し、HIS3遺伝子及びlacZ遺伝子の転写を活性化する転写因子が発現されると、該宿主酵母は十分量の3-AT存在下でも生育可能となり、かつX-galは分解されコロニーは青色となる。ここで、乾燥ストレス応答性エレメント(DRE; dehydration responsive element)は、乾燥ストレスや低温ストレスに曝露された場合に発現される遺伝子上流に存在する9bpの保存的な配列5'-TACCGACAT-3'からなるシス作動性のDNA領域をいう。

【0020】DREを含むDNA断片は、乾燥ストレス耐性遺伝子の1つであるrd29A遺伝子[Kazuko Yamaguchi-Shinozaki and Kazuo Shinozaki: The Plant Cell 6: 251-264 (1994)]のプロモーター領域(rd29A遺伝子の翻訳開始点から-215~-145の領域)を、ポリメラーゼ連鎖反応(PCRともいう)を行い、増幅することにより得ることができる。ここでPCRに用いることができる鋳型DNAとしては、シロイヌナズナのゲノムDNAが挙げられる。またセンスプライマーとしては、5'-AAGCTTAAGCTTACATCAGTTTGAAAGAAA-3'(配列番号11)、アンチセンスプライマーとして

は、5'-AAGCTTAAGCTTGTCTTTTGGAACTCATGTC-3'(配列番号12)を用いることができる。但し、本発明においてはこれらのプライマーに限定されるものではない。

【0021】(3) DREB1A遺伝子及びDREB2A遺伝子のクローニング

DREB1A遺伝子及びDREB2A遺伝子は、上記(1)において得られたcDNAライブラリーを、上記(2)において得られた宿主に、酢酸リチウム法などにより形質転換し、該形質転換体をX-gal(5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトシド)及び3-AT(3-アミノトリアゾール)を含有するLB培地プレートなどに播種・培養後、該プレート上に出現した青色のコロニーからプラスミドを単離することにより得ることができる。

【0022】すなわち、DREB1A遺伝子又はDREB2A遺伝子を含むポジティブクローンは、GAL4活性化ドメイン(GAL4 AD)をコードするDNA領域とDRE結合タンパク質をコードする領域との融合遺伝子を保有し、アルコールデヒドロゲナーゼプロモーターの制御下で、DRE結合タンパク質とGAL4転写活性化ドメインとの融合タンパク質(ハイブリッドタンパク質)を発現する。次いで、発現された融合タンパク質は、DRE結合タンパク質部分を介して、レポーター遺伝子上流のDREに結合し、次いでGAL4活性化ドメインがlacZ遺伝子及びHIS3遺伝子の転写を活性化する。それにより、ポジティブクローンは、著量のHIS3タンパク質及びβ-ガラクトシダーゼを生成する。従って、ポジティブクローンは、生成されたHIS3タンパク質の作用により3-AT存在下でもヒスチジンを生合成することができるため3-AT存在下で生育可能となるとともに、生成されたβ-ガラクトシダーゼの作用による培地中のX-galの分解によりコロニーは青色を呈する。

【0023】次いで、このような青色コロニーからシングルセルアイソレーションを行った後、単離された細胞を培養し、得られる培養細胞からプラスミドDNAを精製することにより、DREB1A遺伝子及びDREB2A遺伝子を得ることができる。

【0024】(4) DREB1Aタンパク質又はDREB2Aタンパク質のホモログ

生物は、1つの遺伝子から進化したと考えられる塩基配列の類似した遺伝子を有していることがある。そのような遺伝子がコードするタンパク質は、互いにホモログといわれ、既に塩基配列が判明している遺伝子の一部をプローブとして、遺伝子ライブラリーの中からクローニングすることができる。従って、シロイヌナズナのcDNAライブラリーの中から、上記(3)において得られたDREB1AcDNA又はDREB2AcDNAをプローブとしてそれらのホモログをコードする遺伝子をクローニングすることができる。

【0025】(5) 塩基配列の決定

上記(3)及び(4)において得られたプラスミドよりcDNA部分を制限酵素で切断し、pSK(Stratagene社製)などの適

切なプラスミドに連結してサブクローニングした後、全塩基配列の決定を行う。塩基配列の決定はマキシム-ギルバートの化学修飾法、又はM13ファージを用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法などの公知手法により行うことができるが、通常は自動塩基配列決定機（例えばPE RKIN-ELMER社製373A DNAシーケンサーなど）を用いて配列決定が行われる。

【0026】配列番号1にはDREB1A遺伝子の塩基配列を、配列番号2には該遺伝子のコードするタンパク質のアミノ酸配列を示す。配列番号3にはDREB2A遺伝子の塩基配列を、配列番号4には該遺伝子のコードするタンパク質のアミノ酸配列を示す。配列番号5にはDREB1B遺伝子の塩基配列を、配列番号6には該遺伝子のコードするタンパク質のアミノ酸配列を示す。配列番号7にはDREB1C遺伝子の塩基配列を、配列番号8には該遺伝子のコードするタンパク質のアミノ酸配列を示す。配列番号9にはDREB2B遺伝子の塩基配列を、配列番号10には該遺伝子のコードするタンパク質のアミノ酸配列を示す。また、前記アミノ酸配列からなるタンパク質がDREに結合しDRE下流の遺伝子の転写を活性化する機能を有する有する限り、当該アミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸に欠失、置換、付加などの変異が生じたタンパク質をコードする変異型遺伝子も本発明に用いることができる。

【0027】例えば、配列番号2、4、6、8又は10で表されるアミノ酸配列の少なくとも1個、好ましくは1～20個程度、さらに好ましくは1～5個のアミノ酸が欠失してもよく、配列番号2、4、8又は10で表わされるアミノ酸配列に少なくとも1個、好ましくは1～20個程度、さらに好ましくは1～5個のアミノ酸が付加してもよく、あるいは、配列番号2、4、8又は10で表わされるアミノ酸配列の少なくとも1個、好ましくは1～160個程度、さらに好ましくは1～40個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換したタンパク質をコードする遺伝子も、当該タンパク質がDREに結合しDRE下流の遺伝子の転写を活性化する機能を有する有する限り、本発明に用いることができる。

【0028】また、上記遺伝子とストリンジентな条件下でハイブリダイズすることができるDNAも、当該DNAがコードするタンパク質がDREに結合しDRE下流の遺伝子の転写を活性化する機能を有する限り、本発明に用いることができる。ストリンジентな条件とは、例えば、ホルムアミド濃度が30～50%、好ましくは50%であり、温度が37～50℃、好ましくは42℃での条件をいう。

【0029】なお、変異型遺伝子は、Kunkel法や Gapped duplex法などの公知の手法又はこれに準ずる方法により、例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット（例えばMutant-K (TAKARA社製)やMutant-G (TAKARA社製) など）を用いて、あるいは、TAKARA社のLA PCR in vitro Mutagenesis シリーズキットを用いて作

製することができる。

【0030】一旦DREB遺伝子の塩基配列が確定されると、その後は化学合成によって、又は本遺伝子のcDNAないしゲノムDNAを鋳型としたPCRによって、あるいは該塩基配列を有するDNA断片をプローブとしてハイブリダイズさせることにより、DREB遺伝子を得ることができる。

【0031】なお、DREB1A又はDREB2A遺伝子を含む組換えベクターは、大腸菌K-12株に導入され、DREB1A遺伝子を含む大腸菌は、識別表示DREB1A、寄託番号FERM P-16936として、DREB2A遺伝子を含む大腸菌は、識別表示DREB2A、寄託番号FERM P-16937として、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成10年8月11日付けで寄託されている。

【0032】2. DREB遺伝子がコードするタンパク質のDRE結合能及び転写活性化能の測定

(1) DREB遺伝子がコードするタンパク質のDRE結合能の解析

DREB遺伝子がコードするタンパク質（以下DREBタンパク質という）がコードするタンパク質のDREへの結合能は、該タンパク質とGSTとの融合タンパク質を用い、ゲルシフトアッセイ [Urao, T et al. : The Plant Cell 5:1529-1539 (1993)] を行うことにより確かめることができる。ここで、DREB1Aタンパク質とGSTとの融合タンパク質は以下のようにして得ることができる。すなわち、まずDREB1A遺伝子をグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 遺伝子をコードするプラスミド（例えば、pGEX-4T-1ベクター (Pharmacia社製) など）中のGSTコード領域の下流にフレームを合わせて連結する。得られたプラスミドを大腸菌に形質転換後、誘導条件下で大腸菌培養し、得られた大腸菌細胞を超音波破碎機などで破碎する。次に破碎液から遠心により細胞破片を除去後、上清をグルタチオン-セファロースなどの担体を用いるアフィニティークロマトグラフィーによって精製し、前記融合タンパク質を得ることができる。

【0033】ゲルシフトアッセイは、DNAとタンパク質との相互作用を調べる方法である。すなわち、³²Pなどで標識したDREを含むDNA断片と前記融合タンパク質とを混合してインキュベーションした後、該混合物を電気泳動し、ゲルを乾燥する。次に、オートラジオグラムをとり、DNA断片とタンパク質との結合に起因する遅れて泳動されたバンドを検出する。本発明において、DREB1Aタンパク質又はDREB2Aタンパク質がDRE配列に特異的に結合していることは、DRE配列に変異を加えたDNA断片を用いた場合に、前記のバンドが検出されないことを明らかにすることにより確認することができる。

【0034】(2) DREB遺伝子がコードするタンパク質の転写活性化能の解析

DREB遺伝子がコードするタンパク質の転写活性化能は、シロイヌナズナのプロトプラストの系を用いるトランスアクチベーション実験法を用いることにより解析するこ

とができる。例えば、DREB1A cDNAをCaMV35Sプロモーターを含むpBI221プラスミド(Clontech社製)に連結し、エフェクタープラスミドを構築する。一方、上記1の(2)において得られるDREを含む71塩基のDNA領域を3カセット結合したDNA断片を、 β -グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子上流のTATAプロモーターのさらに上流に連結し、レポータープラスミドを構築する。次いでこの2種のプラスミドをシロイヌナズナのプロトプラストに導入した後、GUS活性を測定する。ここでDREB1Aタンパク質を同時に発現させることにより、GUS活性の上昇が見られれば、プロトプラスト内で発現したDREB1Aタンパク質が、DREの配列を介して転写を活性化していることがわかる。

【0035】本発明において、プロトプラストの調製及び該プロトプラストへのプラスミドDNAの導入は、Abelらの方法[Abel, S. et al. : Plant J. 5:421-427 (1994)]により行うことができる。また、実験ごとのプラスミドDNAの導入効率の差による実験誤差を最小限にするため、上記2種のプラスミドとともに、CAMV35Sプロモーター下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結したプラスミドをプロトプラストに導入し、ルシフェラーゼ活性に対する β -グルクロニダーゼ活性を測定し、得られた測定値を転写活性化能の値とすることができる。 β -グルクロニダーゼ活性は、Jeffersonらの方法[Jefferson, R. A. et al. : EMBO J. 83 : 8447-8451 (1986)]により、ルシフェラーゼ活性はPicaGeneルシフェラーゼアッセイキット(Toyo-Ink社製)を用いることにより測定することができる。

【0036】3. トランスジェニック植物の作製
遺伝子工学的手法を用いて、上記1. において得られた遺伝子を植物宿主に導入することにより、環境ストレス、特に、低温ストレス(凍結ストレスも含む)、乾燥ストレス、塩ストレスなどに対して抵抗性を有するトランスジェニック植物を作製することができる。遺伝子の植物宿主への導入方法としては、アグロバクテリウム感染法などの間接導入法や、パーティクルガン法、ポリエチレングリコール法、リポソーム法、マイクロインジェクション法などの直接導入法などが挙げられる。アグロバクテリウム感染法を用いる場合、以下のようにしてトランスジェニック植物を作製することができる。

【0037】(1) 植物導入用組換えベクターの作製及びアグロバクテリウムの形質転換

植物導入用組換えベクターは、前記1. において得られたDREB1A遺伝子、DREB1B遺伝子、DREB1C遺伝子、DREB2A遺伝子、又はDREB2B遺伝子を含むDNAを適当な制限酵素で切断後、必要に応じて適切なリンカーを連結し、植物細胞用のクローニングベクターに挿入することにより得ることができる。クローニング用ベクターとしては、pBI2113Not、pBI2113、pBI101、pBI121、pGA482、pGAH、pBIG等のバイナリーベクター系のプラスミドやpLGV23Ne

o、pNCAT、pMON200などの中間ベクター系のプラスミドを用いることができる。

【0038】バイナリーベクター系プラスミドを用いる場合、上記のバイナリーベクターの境界配列(LB, RB)間に、目的遺伝子を挿入し、この組換えベクターを大腸菌中で増幅する。次いで、増幅した組換えベクターをアグロバクテリウム・チューメファシエンスC58、LBA4404、EHA101、C58C1Ri^{fr}、EHA105等に、凍結融解法、エレクトロポレーション法等により導入し、該アグロバクテリウムを植物の形質導入用に用いる。

【0039】上記の方法以外にも、本発明においては、三者接合法[Nucleic Acids Research, 12: 8711 (1984)]によってDREB遺伝子を含む植物感染用アグロバクテリウムを調製することができる。すなわち、目的遺伝子を含むプラスミドを保有する大腸菌、ヘルパープラスミド(例えばpRK2013など)を保有する大腸菌、及びアグロバクテリウムを混合培養し、リファンピシリン及びカナマイシンを含む培地上で培養することにより植物感染用の接合体アグロバクテリウムを得ることができる。

【0040】DREB遺伝子は、転写を活性化するタンパク質をコードする遺伝子であるため、該遺伝子を導入した植物は、発現されたDREBタンパク質の作用で種々の遺伝子が活性化され、それに伴うエネルギー消費の増大や代謝の活性化により植物自身の生育が抑制される場合がある。これを防止するため、ストレス負荷時にのみDREB遺伝子が発現されるように、DREB遺伝子をストレス応答性プロモーターをDREB遺伝子上流に連結することが考えられる。例えば、そのようなプロモーターとしては、例えば以下のものが挙げられる。

【0041】rd29A遺伝子プロモーター[Yamaguchi-Shinozaki, K. et al. : The Plant Cell, 6:251-264 (1994)]。

rd29B遺伝子プロモーター[Yamaguchi-Shinozaki, K. et al. : The Plant Cell, 6:251-264 (1994)]。

rd17遺伝子プロモーター[Iwasaki, T. et al. : Plant Physiol., 115:1287 (1997)]。

rd22遺伝子プロモーター[Iwasaki, T. et al. : Mol. Gen. Genet., 247:391-398 (1995)]。 DREB1A遺伝子プロモーター[Shinwari, Z. K. et al. : Biochem. Biophys. Res. Com. 250:161-170 (1998)]。

【0042】cor6.6遺伝子プロモーター[Wang, H. et al. : Plant Mol. Biol. 28:619-634 (1995)]。

cor15a遺伝子プロモーター[Baker, S. S. et al. : Plant Mol. Biol. 24:701-713 (1994)]。

erd1遺伝子プロモーター[Nakashima K. et al. : Plant J. 12:851-861 (1997)]。

kin1遺伝子プロモーター[Wang, H. et al. : Plant Mol. Biol. 28:605-617 (1995)]。

【0043】但し、ストレス応答性であり、且つ植物体内で機能することが知られている限り、上記プロモータ

ーに限定されるものではない。なお、これらのプロモーターは、該プロモーターを含むDNAの塩基配列に基づいて設計したプライマーを用いて、ゲノムDNAを鋳型として、PCRによる増幅反応によって得ることができる。

【0044】また、必要に応じて転写終結を指令するターミネーターをDREB遺伝子の下流に連結することもできる。ターミネーターとしては、カリフラワーモザイクウイルス由来やノパリン合成酵素遺伝子ターミネーターなどが挙げられる。但し、植物体内で機能することが知られているターミネーターであればこれに限定されるものではない。

【0045】また、必要に応じてプロモーター配列とDREB遺伝子の間に、遺伝子の発現を増強させる機能を持つイントロン配列、例えばトウモロコシのアルコールデヒドロゲナーゼ(Adh1)のイントロン[Genes & Development 1:1183-1200(1987)]を導入することができる。

【0046】さらに、効率的に目的の形質転換細胞を選択するために、有効な選択マーカー遺伝子をDREB遺伝子と併用することが好ましい。その際に使用する選択マーカーとしては、カナマイシン耐性遺伝子(NPTII)、抗生物質ハイグロマイシンに対する抵抗性を植物に付与するハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ(hpt)遺伝子及びビアラホス(bialaphos)に対する抵抗性を付与するホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ(bar)遺伝子等から選ばれる1つ以上の遺伝子を使用することができる。DREB遺伝子及び選択マーカー遺伝子は、単一のベクターと一緒に組み込んでも良いし、それぞれ別個のベクターに組み込んだ2種類の組換えDNAを用いてもよい。

【0047】(2) 植物宿主へのDREB遺伝子の導入
本発明において、植物宿主とは、植物培養細胞、栽培植物の植物体全体、植物器官(例えば葉、花弁、茎、根、根茎、種子等)、又は植物組織(例えば表皮、師部、柔組織、木部、維管束等)のいずれをも意味するものである。植物宿主として用いることができる植物としては、シロイヌナズナ、タバコ、イネ、トウモロコシなどが挙げられる。DREB遺伝子は、採取した植物切片にDREB遺伝子を含むベクターをアグロバクテリウム感染法、パーティクルガン法、又はポリエチレングリコール法などで、上記植物宿主に導入することができる。あるいはプロトプラストにエレクトロポレーション法によりDREB遺伝子を含むベクターを導入することもできる。

【0048】アグロバクテリウム感染法により遺伝子を導入する場合、目的の遺伝子を含むプラスミドを保有するアグロバクテリウムを植物宿主に感染させる工程が必要である。この工程は、バキュームインフィルトレーション法[CR Acad. Sci. Paris, Life Science, 316:1194(1993)]により行うことができる。すなわち、シロイヌナズナをパーミキュライトとパーライトを等量ずつ合わせた土で生育させたシロイヌナズナに、DREB遺伝子を含

むプラスミドを含むアグロバクテリウムの培養液に直接シロイヌナズナを浸し、これをデシケーターに入れバキュームポンプで65～70mmHgになるまで吸引後、5～10分間、室温に放置する。鉢をトレーに移しラップで覆い湿度を保つ。翌日ラップを取り、植物をそのまま生育させ種子を収穫する。

【0049】次いで、目的遺伝子保有個体を選択するために、様々な株由来の種子を適切な抗生物質を加えたMS寒天培地に播種する。この培地で生育したシロイヌナズナを鉢に移し、生育させることにより、本発明に用いる遺伝子が導入されたトランスジェニック植物の種子を得ることができる。

【0050】一般に、植物に導入した遺伝子は、宿主植物のゲノム中に組み込まれるが、その場合、導入されるゲノム上での位置が異なることにより導入遺伝子の発現が異なるポジションイフェクトと呼ばれる現象が見られる。導入遺伝子がより強く発現している形質転換体は、導入遺伝子のDNA断片をプローブとして用いるノーザン法により宿主植物中に発現しているmRNAレベルを検定することによって選抜することができる。

【0051】本発明に用いる遺伝子を導入したトランスジェニック植物及びその次世代に目的の遺伝子が組み込まれていることの確認は、これらの細胞及び組織から常法に従ってDNAを抽出し、公知のPCR法又はサザン分析を用いて導入した遺伝子を検出することにより行うことができる。

【0052】(3) DREB遺伝子の植物組織での発現レベル及び発現部位の分析

DREB遺伝子を導入したトランスジェニック植物における該遺伝子の発現レベル及び発現部位の分析は、これらの細胞及び組織から常法に従ってRNAを抽出し、公知のRT-PCR法又はノーザン分析を用いてDREB遺伝子のmRNAを検出することにより行うことができる。また、DREBタンパク質を、該タンパク質に対する抗体を用いたウエスタン分析等によって直接分析することもできる。

【0053】(4) DREB遺伝子が導入されたトランスジェニック植物体内における各種遺伝子のmRNAレベルの変化
DREB遺伝子が導入されたトランスジェニック植物体内において、DREBタンパク質の作用により、発現レベルが変化したと考えられる遺伝子はノーザン分析によって同定することができる。ノーザン分析においては、DREB遺伝子が導入されたトランスジェニック植物と導入されていない植物とを用いて、標的遺伝子と考えられる遺伝子のmRNAレベルを常法に従って、比較することによって検定することができる。

【0054】例えば、GM寒天培地などで育てた植物に、所定期間(例えば1～2週間)の乾燥及び/又は低温ストレスを与える。乾燥ストレスの負荷は、寒天培地から植物体を、抜き取り濾紙上で10分～24時間乾燥させることにより与えることができる。一方、低温ストレスの負

荷は、15～4℃に10分～24時間保持することにより与えることができる。ストレスを与えないコントロール植物と乾燥及び低温ストレスを与えた植物から全RNAを調製して電気泳動を行い、ノーザン分析又はRT-PCRによって発現している遺伝子を検定する。

【0055】(5) トランスジェニック植物の環境ストレスに対する耐性の評価

DREB遺伝子を導入したトランスジェニック植物の環境ストレスに対する耐性は、パーミキュライト、パーライトなどを含む土を入れた植木鉢にトランスジェニック植物を植え、乾燥・低温・凍結などの各種ストレスを負荷した場合の生存を調べることによって評価することができる。例えば、乾燥ストレスに対する耐性は、2～4週間、水を与えずその生存を調べることに、また凍結ストレスに対する耐性は、-6～-10℃に、5～10日間置いた後、5～10日間、20～25℃で生育させその生存率を調べることににより評価することができる。

【0056】

【実施例】以下に、本発明を実施例を示して具体的に説明するが、本発明に用いる範囲はこれらに限定されるものではない。

【実施例1】DREB1A遺伝子及びDREB2A遺伝子のクローニング

(1) シロイヌナズナ植物体の栽培

LEHLE SEEDSから入手したシロイヌナズナの種子を滅菌液(1%次亜塩素酸ナトリウム、0.02%Triton X-100)に15分間浸漬することにより滅菌し、次いで滅菌水により水洗後、GM寒天培地(1リットル当り：ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類(日本製薬社製)4.6g、MES 0.5g、スクロース30g、寒天8g、pH 5.7)に、40～120粒播種した。そして約1000lux、16時間明期、8時間暗期の光条件下において、22℃で栽培することにより植物体を得た。

【0057】(2) ポリ(A)⁺RNAの調製

上記(1)において得た植物体を、4℃で24時間の低温処理を行った後、グリオキザール法により全RNAを調製し

ポリ(A) ⁺ RNA	5 μ l (5 μ g)
10×第1鎖合成反応用緩衝液	5 μ l
DEPC処理水	34 μ l
40単位/ μ l リボヌクレアーゼインヒビター	1 μ l
第1鎖用ヌクレオチドミックス	3 μ l
1.4 μ g/ μ l リンカープライマー	2 μ l
全量	50 μ l

【0062】上記溶液に、逆転写酵素1.5 μ l (50単位/ μ l)を添加して、37℃で、1時間インキュベートすることにより一本鎖cDNAを合成した。次に、得られた一本鎖cD

一本鎖cDNA反応液	45 μ l
10×第2鎖合成用緩衝液	20 μ l
第2鎖用NTPミックス	6 μ l
1.5単位/ μ l RNase H	2 μ l
9単位/ μ l DNAポリメラーゼI	11 μ l
DEPC処理水	116 μ l
全量	200 μ l

【0064】上記反応液を、16℃で2.5時間インキュベートすることにより二本鎖cDNAを合成した。合成した二

本鎖cDNAを、Pfu DNAポリメラーゼ5単位を用い72℃で30分間インキュベートすることにより末端を平滑した。

【0058】得られた上清をオートクレーブ済の遠心管に入れた17mlのCsTFA溶液(セシウムトリフルオロアセテート(Pharmacia社製)、0.25M EDTA、滅菌水を混合してD=1.51に調整したもの)上に重層後、Beckmann SW28ローター中15℃、25,000×rpmで24時間超遠心しRNAを沈殿させた。次いで得られたRNAを、600 μ lの4M GTC溶液(上記5.5M GTC溶液を滅菌水で希釈してGTC濃度が4Mとなるようにしたもの)に溶解しエタノール沈殿を行うことにより目的の全RNAを得た。

【0059】上記全RNAを、2mlのTE/NaCl(TEと1M NaClを1:1の割合で混合したもの)に溶解し、既にTE/NaClで平衡化しておいたオリゴdTセルロースカラム(Collaborative research社製オリゴdTセルロース(type 3)をBio-Rad社製エコノカラム(直径0.6cm)に高さ1.5cmとなるように詰めたもの)に通し、通過した溶液をもう一度カラムに通した。次いで、約8mlのTE/NaClでカラムを洗浄後、TEを加えてポリ(A)⁺RNAを溶出・精製した。得られたRNAの量は、UV分光器により測定した。

【0060】(3) cDNAライブラリーの合成

上記(2)により得られたポリ(A)⁺RNA 5 μ gを用いて、cDNA合成キット(Stratagene社製)により二本鎖cDNAを合成後、該二本鎖cDNAをpAD-GAL4プラスミド(Stratagene社製)に連結しcDNAライブラリーを合成した。すなわち、まず、キットに添付のプロトコルに従い、以下の反応溶液中で一本鎖cDNAを合成した。

【0061】

NAの反応液に、以下の試薬を順に加えた。

【0063】

本鎖cDNAを、Pfu DNAポリメラーゼ5単位を用い72℃で30分間インキュベートすることにより末端を平滑した。

次いで、フェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿を行った後、得られたペレットに9 μ lのEcoRI-NotI-BamHIアダプター (TAKARA社製)、1 μ lの10 \times リガーゼ緩衝液、1 μ lのATP、1 μ lのT4 DNAリガーゼ (4単位/ μ l)を加え、4 $^{\circ}$ Cで2日間インキュベートすることにより、二本鎖cDNAにアダプターを付加した。次いで、両端にEcoRI制限酵素部位を有するcDNAを、クローニングベクターであるpAD-GAL4プラスミド (Stratagene社製) のGAL4の活性化ドメインの下流のEcoRI部位に、T4DNAリガーゼを用いて連結することによりcDNAライブラリーを合成した。

【0065】(4) ゲノムDNAの調製

上記(1)において得られた植物体から、Molecular Cloning [Maniatis, T. et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 187-198, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1982)]に記載の方法に従って、ゲノムDNAを調製した。すなわち、シロイヌナズナ植物体50gに2,000mlの破碎用緩衝液 (0.35Mスクロース、1M Tris-HCl (pH8.0)、5mM MgCl₂、50mM KCl)を加えて、ワーリングブレンダーで1分間の粉碎を3回行うことによりホモジナイズした。

【0066】摩砕液を濾過することにより、細胞残渣を除去し、濾液を遠心管に分注し、スイングローターで3,000 \times g、4 $^{\circ}$ Cで10分間低速遠心した。遠心後、上清を捨て沈殿を氷冷した30mlの破碎用緩衝液に懸濁してから再度低速遠心した。緑色の沈殿が白くなるまで同じ操作を3回繰り返した。

【0067】得られた白い沈殿を氷冷した10mlのTEに懸濁した後、10mlの溶解液 (0.2M Tris-HCl (pH8.0)、50mM

EDTA、2%N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム)を加えた。0.1mlのプロティナーゼK (10mg/ml)を加え細胞核を消化後、得られた消化液を、フェノール処理及びエタノール沈殿させた。次いで沈殿により得られるDNA繊維を3,000 \times g、5分間の遠心により回収し、これを1mlのTEに溶解してゲノムDNAを得た。

【0068】(5) 酵母ワンハイブリッドスクリーニングに用いる酵母宿主の構築

本発明に用いる転写因子をコードする遺伝子をクローニングするために、HIS3レポーター遺伝子又はlacZレポーター遺伝子の上流に、DREモチーフを含むDNA領域をそれぞれ4カセット連結した2種類のプラスミドを含む、DRE結合タンパク質遺伝子クローニング用宿主を構築した (図1)。すなわち、まず、本発明に用いる転写因子が結合するDRE配列を含む、rd29A遺伝子プロモーター領域 (rd29A遺伝子の翻訳開始点から-215~-145の領域)をPCR法により増幅した。すなわち、センスプライマーとして、5'-AAGCTTAAGCTTACATCAGTTTGAAGAAA-3' (配列番号11)を、アンチセンスプライマーとして、5'-AAGCTTAAGCTTCTTTTGAAGTTCATGTC-3' (配列番号12)を合成した。ここで、これらのプライマーには、増幅後、PCR断片を容易にベクターに連結することができるよう、5'末端にHindIII切断部位を導入した。なお、これらの合成プライマーは、全自動DNA合成機 (Perkin-Elmer社製)を使用して化学合成した。これらのプライマーを用い、上記(3)において調製したゲノムDNAを鋳型としてPCRを行った。PCRの反応液の組成は以下の通りである。

【0069】

ゲノムDNA溶液	5 μ l (100ng)
滅菌水	37 μ l
10 \times PCR緩衝液 (1.2M Tris-HCl (pH8.0)、100mM KCl、60mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 、1% Triton X-100、0.1mg/ml BSA)	5 μ l
50pmol/ μ l プライマー (センス)	1 μ l (50pmol)
50pmol/ μ l プライマー (アンチセンス)	1 μ l (50pmol)
KOD DNAポリメラーゼ (Kod-101, TOYOBO社製)	1 μ l (2.5単位)
全量	50 μ l

【0070】上記反応液を、よく混合後、ミネラルオイルを50 μ l重層した。PCRは、98 $^{\circ}$ Cで15秒間の熱変性、65 $^{\circ}$ Cで2秒間のアニーリング、74 $^{\circ}$ Cで30秒間の伸長反応の条件を1サイクルとして、25サイクル行った。反応終了後、クロロホルム50 μ lを加え混合し、4 $^{\circ}$ C、15,000rpmで15分間遠心し、上層を新しいマイクロチューブに回収した。そこにエタノール100 μ lを加えよく混合後、4 $^{\circ}$ C、15,000rpmで15分間遠心しPCR産物をペレット化した。

【0071】得られたPCR産物をHindIIIで切断後ベクターpSKのHindIII部位に連結し、この組換えプラスミドを大腸菌に形質転換した。形質転換体よりプラスミドDNAを調製し、塩基配列を決定することにより、4回同じ方向にDNA断片が結合されたものを選抜した。

【0072】これをEcoRIとHincIIで切り出した後、得

られたDNA断片を酵母の発現ベクターであるpHISi-1 (Clontech社製) のHIS3最小プロモーター上流のEcoRI-MluI部位に連結した。また、同様に、DREを4カセット含むDNA断片をpSKからEcoRIとHincIIで切り出し、酵母の発現ベクターpLacZi (Clontech社製) のlacZ最小プロモーターの上流のEcoRI-SalI部位に連結した。得られた2種のプラスミドをSaccharomyces cerevisiae YMA4271 (MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, leu2-3, 112, trp1-903) (Clontech社製) に形質転換することにより、酵母ワンハイブリッドスクリーニングに用いる酵母宿主を得た (図1)。

【0073】(6) DREB1A遺伝子及びDREB2A遺伝子のクローニング

上記(3)において調製したcDNAライブラリーを用いて1.2 \times 10⁶の酵母の形質変換体をスクリーニングした。そ

の結果、2種のポジティブクローンを得た。得られたcDNAをpAD-GAL4プラスミドからEcoRIを用いて切り出し、pSKプラスミドのEcoRI部位に結合して、組換えプラスミドpSKDREB1A及びpSKDREB2Aを得た。

【0074】(7) 塩基配列の決定

このプラスミドpSKDREB1A及びpSKDREB2Aを用いて、得られたcDNAの全塩基配列を決定した。プラスミドpSKDREB1A及びpSKDREB2Aは、培養した大腸菌細胞中から自動プラスミド調製機(KURABO社製Model PI-100)によって調製した。塩基配列決定のための反応は、反応用ロボット(Perkin Elmer社製CATALYST 800)を用いて行った。塩基配列決定は、自動塩基配列決定機(Perkin Elmer社製Model 373A)を用いて行った。その結果、プラスミドpSKDREB1A中のcDNAは、933 bpの塩基から構成されており(配列番号1)、該塩基配列中には216アミノ酸残基からなる推定分子量約24.2キログルトンのタンパク質(配列番号2)をコードする唯一のオープンリーディングフレームの存在することがわかった。一方プラスミドpSKDREB2AのcDNAは、1437bpの塩基から構成されており(配列番号3)、該塩基配列中には335アミノ酸残基からなる推定分子量約37.7キログルトンのタンパク質(配列番号4)をコードする唯一のオープンリーディングフレームの存在することがわかった。

【0075】(8) DREB1Aタンパク質又はDREB2Aタンパク質のホモログをコードする遺伝子の単離

上記(6)において得られたDREB1A遺伝子又はDREB2A遺伝子がコードするタンパク質のホモログをコードする遺伝子を単離した。すなわち、上記(5)において得られたDREB1A遺伝子を含む二本鎖cDNA断片又はDREB2A遺伝子を含む二本鎖cDNA断片をプローブとして、Molecular Cloning[Sambrook, J et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 10 Skyline Drive Plainview, NY (1989)]に記載の方法に従い、シロイヌナズナの λ gt11c DNAライブラリーから、ホモログをコードする遺伝子を単離した。DREB1Aタンパク質のホモログをコードする遺伝子として、DREB1B遺伝子及びDREB1C遺伝子を、DREB2Aタンパク質のホモログをコードする遺伝子としてDREB2B遺伝子を得た。塩基配列決定したところ、DREB1B遺伝子(配列番号5)はCBF1と呼ばれる遺伝子[Stockinger, E. J. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1035-1040 (1997)]と同一であったが、DREB1C遺伝子(配列番号7)、DREB2B遺伝子(配列番号9)は新規であった。

【0076】オープンリーディングフレームの解析からDREB1C遺伝子がコードする遺伝子産物は216アミノ酸残基よりなる分子量約24.3キログルトンのタンパク質(配列番号8)であり、DREB2B遺伝子がコードする遺伝子産物は330アミノ酸残基よりなる分子量約37.1キログルトンのタンパク質(配列番号10)であった。

【0077】〔実施例2〕DREB1Aタンパク質及びDREB2A

タンパク質のDREへの結合能の解析

DREB1Aタンパク質及びDREB2Aタンパク質のDREへの結合能を、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)と該タンパク質との融合タンパク質を大腸菌を用いて調製し、ゲルシフトアッセイにより調べた。DREB1AcDNAの塩基配列の119番目から547番目の429塩基のDNA断片又はDREB2AcDNAの塩基配列の167番目から666番目の500塩基のDNA断片をPCRによって増幅後、該増幅断片をプラスミドpGEX-4T-1(ファルマシア)のEcoRI-SalI部位に結合した。これを大腸菌JM109に導入したのち、大腸菌を200 mlの2x YT培地(Molecular Cloning (1982) Cold Spring Harbor Laboratory Press)で培養して、これにプラスミドpGEX-4T-1中のプロモーターを活性化させる1 mMのイソプロピル β -D-チオガラクトシドを加え、DREB1Aタンパク質とGSTとの融合タンパク質の合成を誘導した。

【0078】タンパク質を行った大腸菌を、13 mlの緩衝液(10 mM Tris-HCl, 0.1 mM DTT, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)に懸濁した後、1% Triton X-100と1 mM EDTAを加え、細胞を超音波で破壊した。得られた細胞破砕物を、22,000 \times gで20分間遠心し、グルタチオン-セファロース(Pharmacia製)を担体とするアフィニティークロマトグラフィーによってDREB1Aタンパク質又はDREB2Aタンパク質とGSTとの融合タンパク質を精製した。次に、融合タンパク質を、PCRによって調製したDRE配列を含む71塩基のDNA断片プローブとともに(32 Pで放射能標識したもの)室温で20分間インキュベートした。これを0.25x Tris-borate-EDTAを含む6%アクリルアミドを用いて、100Vで2時間の電気泳動を行った。電気泳動後のゲルについてのオートラジオグラムの結果を図2に示した。この図からも明らかのように、融合タンパク質をDRE配列を含む71塩基のDNA断片プローブ(配列番号18)とともにインキュベートしたものは、遅れて泳動するバンドが検出された。また、DRE配列に変異を加えたDNA断片(配列番号19、配列番号20、配列番号21)をプローブとして用いた場合はこのバンドは検出されず、一方DRE配列の外に変異を加えたDNA断片(配列番号22、配列番号23)をプローブとして用いた場合には、バンドが検出された。このことから、DREB1Aタンパク質又はDREB2Aタンパク質がDRE配列に特異的に結合していることがわかった。

【0079】〔実施例3〕DREB1Aタンパク質及びDREB2Aタンパク質のDRE下流遺伝子の転写活性化能の解析

DREB1Aタンパク質及びDREB2Aタンパク質が、植物細胞内におけるDRE依存的な転写をトランスに活性化し得るかどうかを調べるため、シロイヌナズナの葉から調製したプロトプラストの系を用いて、トランスアクチベーション実験を行った。すなわち、まず、DREB1A又はDREB2AのcDNAをCaMV35Sプロモーターを含むpBI221プラスミドに連結することによりエフェクタープラスミドを構築した。レポータープラスミドを得るため、DREの配列を合

む71塩基の配列を三個結合したDNA断片をrd29A遺伝子の最小限のTATAプロモーターと β -グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子に結合した。この2種のエフェクタープラスミドとレポータープラスミドとをシロイヌナズナのプロトプラストに導入したのち、GUS活性を測定した。DREB1Aタンパク質又はDREB2Aタンパク質を同時に発現させるとGUS活性の上昇が見られ、DREB1Aタンパク質はDREの配列を介して転写を活性化している転写因子であることが示された(図3)。

【0080】〔実施例4〕CaMV35Sプロモーターの下流にDREB1A遺伝子をコードするDNAを連結した遺伝子を含むトランスジェニック植物の作製

(1) 植物プラスミドの構築

上記のようにして得られたpSKDREB1A(10 μ g)を、10mM TrisHCl(pH7.5)/10mM MgCl₂/1mMジチオスレイトール/100 mM NaCl中、EcoRV(20ユニット)とSmaI(20ユニット)を用いて37℃で2時間切断し、DREB1A遺伝子を含む約0.9 kbのDNA断片を得た。一方、プロモーターDNAを持つプラスミドpBI2113Not(10 μ g)を、10 mM TrisHCl(pH7.5)/10mM MgCl₂/1mMジチオスレイトール(DTT)/100 mM NaCl中、SmaIを用いて37℃で2時間切断した。DREB1A遺伝子を含む0.9kbの前記DNA断片とpBI2113Notとを、66 mM TrisHCl(pH7.6)/6.6 mM MgCl₂/10 mM DTT/0.1 mM ATP中、T4DNAリガーゼ(2ユニット)を用いて、15℃で16時間反応させることにより連結し、得られた連結物を大腸菌JM109に形質転換した。得られた形質転換体を培養後、該培養物からプラスミドpBI35S:DREB1Aを精製した(図4)。次に塩基配列の決定を行いDREB1A遺伝子がセンス方向に結合したものを選抜した。ここで、pBI2113Notプラスミドは、pBI2113プラスミド[Plant Cell Physiology 37:49-59(1996)]をSmaIとSacIで切断して、GUS遺伝子のコード領域を取り除き、これにSmaI-NotI-SacIポリリンカーを結合することにより調製した。

【0081】(2) 植物プラスミドpBI35S:DREB1Aを含む接合体アグロバクテリウムの調製

上記(1)において得られた植物プラスミドpBI35S:DREB1Aを持つ大腸菌DH5a、ヘルパープラスミドpRK2013を持つ大腸菌HB101及びアグロバクテリウムC58をLB培地を用いて28℃でLB寒天培地上で24時間混合培養した。生育したコロニーを1 mlのLB培地にかけとり懸濁した。この懸濁液10mlをリファンピシリン100 μ g/ml、及びカナマイシン20 μ g/mlを含むLB寒天培地に塗り、28℃で2日間培養して、接合体アグロバクテリウムC58(pBI35S:DREB1A)を得た。

【0082】(3) アグロバクテリウム感染法によるシロイヌナズナへの遺伝子導入

この接合体をリファンピシリン100 μ g/ml、及びカナマイシン20 μ g/mlを含むLB培地(10 ml)中28℃で24時間培養した。さらに、この培養液を500 mlのLB培地に加えて24時間培養した。この培養液を遠心して培地を除

き、さらに250 mlのLB培地に懸濁した。

【0083】一方、バーミキュライトとパーライトとを等量ずつ合わせた土を入れた9 cmの植木鉢で4から5本のシロイヌナズナを6週間育てた。プラスミドpBI35S:DREB1Aを含むアグロバクテリウムのLB培養液に直接上記のシロイヌナズナを浸して、これをデシケーターに入れバキュームポンプで650mmHgになるまで吸引後、そのまま10分放置した。鉢をトレーに移しラップで覆い湿度を保った。翌日ラップを取り、植物をそのまま生育させ種子を得た。種子は次亜塩素酸ナトリウム水溶液で滅菌後、選択用のMS培地にバンコマイシン100 μ g/ml、カナマイシン30 μ g/mlを加えた寒天培地に蒔いた。この培地で生育したシロイヌナズナを鉢に移し形質転換植物体の種子を得た。

【0084】(4) 導入遺伝子と導入遺伝子がコードする転写因子が発現を変化させた遺伝子の同定

形質転換体の導入遺伝子DREB1Aと導入遺伝子が発現を変化させたと考えられる遺伝子のmRNAレベルをノーザン分析により調べた。すなわち、DREB1A遺伝子、rd29A遺伝子、kin1遺伝子、cor6.6遺伝子、cor6.6遺伝子、cor15a遺伝子、rd17遺伝子、erd10遺伝子、P5CS遺伝子、erd1遺伝子、rd22遺伝子、rd29B遺伝子の部分断片をプローブとして。ノーザン分析にはシロイヌナズナの形質転換体の他に形質転換していない植物を用いて遺伝子の発現を比較することで検定した。2 gの3週間GM寒天培地で育てた植物に乾燥及び低温ストレスを与えた。乾燥ストレスについては寒天培地から抜き取り濾紙上で5時間乾燥させた。低温ストレスについては植物体を4℃に5時間保温した。ストレスを与えないコントロールの植物と上記乾燥と低温ストレスを与えた植物から全RNAを調製して、電気泳動を行いノーザン法で発現している遺伝子を検定した。一般に、形質転換体においては遺伝子は同様にゲノムに導入されるが、その導入場所が異なることから、導入遺伝子の発現が異なるポジションイフェクトと呼ばれる現象が見られる。プローブとして導入遺伝子のDNA断片を用い、ノーザン法で検定することより導入遺伝子が強く発現している形質転換体を選抜した。また、プローブとして上記のストレス耐性に関与している可能性のある遺伝子のDNA断片を用い、DREB1A遺伝子を導入することでmRNAレベルの変化した遺伝子を同定した(図5)。

【0085】(5) 乾燥・凍結ストレスに対する耐性の発現

3週間バーミキュライトとパーライトを等量ずつ合わせた土を入れた9 cmの植木鉢で育てたシロイヌナズナの形質転換体を用いて乾燥・凍結耐性に関して検討した。形質転換体とコントロールとしてDREB1A遺伝子を含まないpBI121を形質転換したシロイヌナズナを用いて乾燥ストレスに対する耐性、凍結ストレスに対する耐性を検討した。乾燥ストレスに対する耐性の検討では2週間水を止

めその生存を調べた。また凍結耐性では -6°C に2日間置いた後5日間 22°C で生育させその生存率を調べた。

【0086】その結果、コントロールではすべての植物が枯れてしまったが、DREB1A遺伝子を導入したトランスジェニック植物では高い生存率を示した(図6)。しかし、これらのトランスジェニック植物においては成長の抑制及び矮化が見られた。

【0087】〔実施例5〕rd29A遺伝子プロモーターの下流にDREB1A遺伝子をコードするDNAを連結した遺伝子を含むトランスジェニック植物の作製

(1) rd29A遺伝子プロモーターを含むpBI29APNotベクターの構築

両端にHindIII部位を結合したrd29Aプロモーター領域(rd29A遺伝子の翻訳開始点から $-861\sim+63$ の領域)を以下のプライマーを用い、実施例2の(4)と同条件でPCR法にて作出した(配列番号17)。用いたプライマーの塩基配列は5'-AAGCTTAAGCTTGCCATAGATGCAATTCATC-3'(配列番号13)と5'-AAGCTTAAGCTTTTCCAAAGATTTTTTCTTTCCAA-3'(配列番号14)であった。PCRで得られたDNA断片はHindIIIで切断後、植物のバイナリーベクターであるpBI101(Clontech, Palo Alto, CA, USA)のHindIII部位に結合した。pBI101は β -グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子がコードされているのでこれをSmaIとSacIで切断してSmaI-NotI-SacIポリリンカーで結合した。これを大腸菌DH5aに導入してプラスミドpBI29APNotを調製した。

【0088】(2) rd29A遺伝子プロモーターを用いた植物プラスミドpBI29AP:DREB1Aの構築
DREB1A遺伝子は、実施例1において得られたpSKDREB1Aを鋳型として、PCR法により増幅した。すなわち、センスプライマーとして、5'-GGATCCGGATCCATGAATCATTTTCTGCT-3'(配列番号15)を、アンチセンスプライマーとして、5'-GGATCCGGATCCTTAATAACTCCATAACGATA-3'(配列番号16)を合成した。ここで、これらのプライマーには、増幅後、PCR断片を容易にベクターに連結することができるよう、5'末端にBamHI切断部位を導入した。このPCR産物を1%アガロースゲル電気泳動に供試し、900~1000bp付近の大きさのPCR産物をゲルから切り出した。このゲル断片を新しいマイクロチューブに移した後、 67°C に10分間保持することによりゲルを溶解した。得られたゲル溶解物に等容量のTEを加えよく混合した後、フェノール抽出した。さらに得られた抽出物を1,600 \times gで3分間遠心後、水層を再びフェノール抽出、フェノール/クロロホルム抽出し、水層に冷エタノールを加えエタノール沈殿しPCR産物を得た。

【0089】得られたPCR産物10 μg を、30 μl のTEに溶解し、これをBamHI(20ユニット)で切断した。 70°C で1時間加温して、BamHIを失活させた後、フェノール抽出、エタノール沈殿によりDREB1A遺伝子を含むDNA断片を回収した。次いで、このDNA断片を、ベクターpBI29APNotのBamHI部位に連結し、この組換えプラスミドを大腸菌

(DH5 α 株)に形質転換後、形質転換体をカナマイシン耐性により選択し、得られた形質転換体をLB培地で培養後、抽出精製することにより植物プラスミドpBI29AP:DREB1Aを得た(図7)。

【0090】(4) 植物プラスミドpBI29AP:DREB1Aを含む接合体アグロバクテリウムの調製

上記(3)において得られた組換えプラスミドpBI29AP:DREB1Aを用いて、実施例5(2)と同様の手順により植物プラスミドpBI29AP:DREB1Aを含む接合体アグロバクテリウムを調製した。

(5) アグロバクテリウム感染法によるシロイヌナズナの遺伝子導入

上記(4)において得られた接合体アグロバクテリウムを用いて、実施例5(3)と同様の手順により植物プラスミドpBI29AP:DREB1Aをシロイヌナズナに導入した。

【0091】(6) 形質転換体の成長及び乾燥・凍結・塩ストレス耐性の観察

上記(5)において得られたrd29A遺伝子プロモーター下流にDREB1A遺伝子を連結したプラスミドを導入したシロイヌナズナのトランスジェニック植物体、実施例5において得られたCaMV35S遺伝子プロモーター下流にDREB1A遺伝子を連結したプラスミドを導入した得られたシロイヌナズナのトランスジェニック植物体、及びコントロールとして形質転換していない植物体を同一条件下で栽培し、成長及び乾燥・凍結・塩ストレス負荷後の生存率を調べた。すなわち、パーミキュライト及びパーライトを等量ずつ合わせた土を入れた9cmの植木鉢に各植物体を植え露地栽培した。図8は栽培を始めてから35日目(図8A及び図9A)と65日目(図8B及び図9B)の成長を示す植物体の写真である。pBI35S:DREB1Aを導入したトランスジェニック植物では株によって成長の度合いに差が見られるが、成長に大きな阻害が見られた(図8A及び図8B)。これに対してpBI29AP:DREB1Aを導入したトランスジェニック植物ではほとんど成長に阻害が見られなかった(図9A及び図9B)。

【0092】次に、ストレスに対する耐性を調べた。すなわち、乾燥ストレスに対する耐性の検討では2週間水を与えなかった場合の生存、凍結ストレスに対する耐性では -6°C に2日間置いた後5日間 22°C で生育させた場合の生存、塩ストレスに対する耐性は600mM NaClに2時間浸した後、鉢に移し3週間生育させた場合の生存を調べた。その結果、図10及び表1~3のように、乾燥又は凍結ストレスを与えたコントロールの植物はすべて枯れた。塩ストレスを与えたコントロールの植物も生存するものはわずかであった。pBI35S:DREB1Aを導入したトランスジェニック植物では株によってその生存率に差が見られ、導入したDREB1A遺伝子の発現が強い植物ほど耐性が高かった。これに対してpBI29AP:DREB1Aを導入した形質転換体では43種を解析したが耐性度はほとんど同様であり、pBI35S:DREB1Aを導入した形質転換体よりも

高い生存率を示した。このように、本発明により作出した植物は、高いレベルの乾燥・凍結・塩耐性を有し且つ良好な成長を示すことがわかった。

【0093】

表1 凍結ストレス負荷後のトランスジェニック植物の生存率

	生存個体数	全個体数	生存率(%)
rd29A:DREB1A	143	144	99.3
35S:DREB1Ab	47	56	83.9
35S:DREB1Ac	15	42	35.7
野生株	0	55	0.0

【0094】

表2 乾燥ストレス負荷後のトランスジェニック植物の生存率

	生存個体数	全個体数	生存率(%)
rd29A:DREB1A	52	80	65.0
35S:DREB1Ab	15	35	42.9
35S:DREB1Ac	6	28	21.4
野生株	0	25	0.0

【0095】

表3 塩ストレス負荷後のトランスジェニック植物の生存率

	生存個体数	全個体数	生存率(%)
rd29A:DREB1A	119	149	79.9
35S:DREB1Ab	4	24	16.7
野生株	4	29	13.8

【0096】

【発明の効果】本発明により、ストレス応答性プロモーターの下流に、ストレス応答性エレメントに結合し該エレメント下流の遺伝子の転写を制御するタンパク質をコードするDNAが連結された遺伝子を含む、環境ストレス

(乾燥ストレス、低温ストレス、塩ストレスなど)に対する耐性が向上し且つ矮化の起こらないトランスジェニック植物が提供される。

【0097】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Nobuyoshi Maeno, Director General, Japan International Research Center for Agricultural Sciences ; Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

<120> Environmental Stress-resistant Plant

<160> 23

<210> 1

<211> 933

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>

<221> CDS

<222> (119).. (766)

<400> 1

cctgaactag aacagaaaga gagagaaact attatltcag caaacatalac caacaaaaaa 60
gacagagatc ttttagtlac ctatccagt ttcttgaaac agagtactct tctgalca 118
atg aac tca ttt tct gct ttt tct gaa atg ttt ggc tcc gat tac gag 166
Met Asn Ser Phe Ser Ala Phe Ser Glu Met Phe Gly Ser Asp Tyr Glu

1

5

10

15

```

tct tgc gtt tcc tca ggc ggt gat tat att ccg acg ctt gcg agc agc 214
Ser Ser Val Ser Ser Gly Gly Asp Tyr Ile Pro Thr Leu Ala Ser Ser
      20              25              30
tgc ccc aag aaa ccg gcg ggt cgt aag aag ttt cgt gag act cgt cac 262
Cys Pro Lys Lys Pro Ala Gly Arg Lys Lys Phe Arg Glu Thr Arg His
      35              40              45
cca ata tac aga gga gtt cgt cgg aga aac tcc ggt aag tgg gtt tgt 310
Pro Ile Tyr Arg Gly Val Arg Arg Arg Asn Ser Gly Lys Trp Val Cys
      50              55              60
gag gtt aga gaa cca aac aag aaa aca agg att tgg ctc gga aca ttt 358
Glu Val Arg Glu Pro Asn Lys Lys Thr Arg Ile Trp Leu Gly Thr Phe
      65              70              75              80
caa acc gct gag atg gca gct cga gct cac gac gtt gcc gct tta gcc 406
Gln Thr Ala Glu Met Ala Ala Arg Ala His Asp Val Ala Ala Leu Ala
      85              90              95
ctt cgt ggc cga tca gcc tgt ctc aat ttc gct gac tgc gct tgg aga 454
Leu Arg Gly Arg Ser Ala Cys Leu Asn Phe Ala Asp Ser Ala Trp Arg
      100             105             110
ctc cga atc ccg gaa tca act tgc gct aag gac atc caa aag gcg gcg 502
Leu Arg Ile Pro Glu Ser Thr Cys Ala Lys Asp Ile Gln Lys Ala Ala
      115             120             125
gct gaa gct gcg ttg gcg ttt cag gat gag atg tgt gat gcg acg acg 550
Ala Glu Ala Ala Leu Ala Phe Gln Asp Glu Met Cys Asp Ala Thr Thr
      130             135             140
gat cat ggc ttc gac atg gag gag acg ttg gtg gag gct att tac acg 598
Asp His Gly Phe Asp Met Glu Glu Thr Leu Val Glu Ala Ile Tyr Thr
      145             150             155             160
gcg gaa cag agc gaa aat gcg ttt tat atg cac gat gag gcg atg ttt 646
Ala Glu Gln Ser Glu Asn Ala Phe Tyr Met His Asp Glu Ala Met Phe
      165             170             175
gag atg ccg agt ttg ttg gct aat atg gca gaa ggg atg ctt ttg ccg 694
Glu Met Pro Ser Leu Leu Ala Asn Met Ala Glu Gly Met Leu Leu Pro
      180             185             190
ctt ccg tcc gta cag tgg aat cat aat cat gaa gtc gac ggc gat gat 742
Leu Pro Ser Val Gln Trp Asn His Asn His Glu Val Asp Gly Asp Asp
      195             200             205
gac gac gta tgc tta tgg agt tat taaaactcag attattatattt ccatttttag 796
Asp Asp Val Ser Leu Trp Ser Tyr
      210             215
tacgatactt tttattttat tattattttt agatcctttt ttagaatgga atcttcattt 856
tgtttgtaaa actgagaaac gagtgtaaata taaattgatt cagtttcagt ataaaaaaaa 916
aaaaaaaaaa aaaaaaa
                                             933

```

<210> 2

<211> 216

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Met Asn Ser Phe Ser Ala Phe Ser Glu Met Phe Gly Ser Asp Tyr Glu

1	5	10	15
Ser Ser Val Ser Ser Gly Gly Asp Tyr Ile Pro Thr Leu Ala Ser Ser			
20	25	30	
Cys Pro Lys Lys Pro Ala Gly Arg Lys Lys Phe Arg Glu Thr Arg His			
35	40	45	
Pro Ile Tyr Arg Gly Val Arg Arg Arg Asn Ser Gly Lys Trp Val Cys			
50	55	60	
Glu Val Arg Glu Pro Asn Lys Lys Thr Arg Ile Trp Leu Gly Thr Phe			
65	70	75	80
Gln Thr Ala Glu Met Ala Ala Arg Ala His Asp Val Ala Ala Leu Ala			
85	90	95	
Leu Arg Gly Arg Ser Ala Cys Leu Asn Phe Ala Asp Ser Ala Trp Arg			
100	105	110	
Leu Arg Ile Pro Glu Ser Thr Cys Ala Lys Asp Ile Gln Lys Ala Ala			
115	120	125	
Ala Glu Ala Ala Leu Ala Phe Gln Asp Glu Met Cys Asp Ala Thr Thr			
130	135	140	
Asp His Gly Phe Asp Met Glu Glu Thr Leu Val Glu Ala Ile Tyr Thr			
145	150	155	160
Ala Glu Gln Ser Glu Asn Ala Phe Tyr Met His Asp Glu Ala Met Phe			
165	170	175	
Glu Met Pro Ser Leu Leu Ala Asn Met Ala Glu Gly Met Leu Leu Pro			
180	185	190	
Leu Pro Ser Val Gln Trp Asn His Asn His Glu Val Asp Gly Asp Asp			
195	200	205	
Asp Asp Val Ser Leu Trp Ser Tyr			
210	215		

<210> 3

<211> 1437

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (167).. (1171)

<400> 3

```

gctgtctgat aaaaagaaga ggaaaactcg aaaaagctac acacaagaag aagaagaaaa 60
gatacgagca agaagactaa acacgaaagc gatattatcaa ctggaaggaa gagactttga 120
ttttcaaatt tcgtccccta tagatttgtt tgtttctggg aaggag atg gca gtt 175
                                     Met Ala Val
                                     1
tat gat cag agt gga gat aga aac aga aca caa att gat aca tcg agg 223
Tyr Asp Gln Ser Gly Asp Arg Asn Arg Thr Gln Ile Asp Thr Ser Arg
      5              10              15
aaa agg aaa tct aga agt aga ggt gac ggt act act gtg gct gag aga 271
Lys Arg Lys Ser Arg Ser Arg Gly Asp Gly Thr Thr Val Ala Glu Arg
      20              25              30              35
tta aag aga tgg aaa gag tat aac gag acc gta gaa gaa gtt tct acc 319

```


Leu	Lys	Arg	Trp	Lys	Glu	Tyr	Asn	Glu	Thr	Val	Glu	Glu	Val	Ser	Thr	
				40					45					50		
aag	aag	agg	aaa	gta	cct	gcg	aaa	ggg	tcg	aag	aag	ggg	tgt	atg	aaa	367
Lys	Lys	Arg	Lys	Val	Pro	Ala	Lys	Gly	Ser	Lys	Lys	Gly	Cys	Met	Lys	
				55				60					65			
ggt	aaa	gga	gga	cca	gag	aat	agc	cga	tgt	agt	ttc	aga	gga	gtt	agg	415
Gly	Lys	Gly	Gly	Pro	Glu	Asn	Ser	Arg	Cys	Ser	Phe	Arg	Gly	Val	Arg	
				70				75					80			
caa	agg	att	tgg	ggg	aaa	tgg	gtt	gct	gag	atc	aga	gag	cct	aat	cga	463
Gln	Arg	Ile	Trp	Gly	Lys	Trp	Val	Ala	Glu	Ile	Arg	Glu	Pro	Asn	Arg	
				85				90					95			
ggt	agc	agg	ctt	tgg	ctt	ggg	act	ttc	cct	act	gct	caa	gaa	gct	gct	511
Gly	Ser	Arg	Leu	Trp	Leu	Gly	Thr	Phe	Pro	Thr	Ala	Gln	Glu	Ala	Ala	
100				105						110			115			
tct	gct	tat	gat	gag	gct	gct	aaa	gct	atg	tat	ggg	cct	ttg	gct	cgt	559
Ser	Ala	Tyr	Asp	Glu	Ala	Ala	Lys	Ala	Met	Tyr	Gly	Pro	Leu	Ala	Arg	
				120					125				130			
ctt	aat	ttc	cct	cgg	tct	gat	gcg	tct	gag	gtt	acg	agt	acc	tca	agt	607
Leu	Asn	Phe	Pro	Arg	Ser	Asp	Ala	Ser	Glu	Val	Thr	Ser	Thr	Ser	Ser	
				135				140					145			
cag	tct	gag	gtg	tgt	act	gtt	gag	act	cct	ggg	tgt	gtt	cat	gtg	aaa	655
Gln	Ser	Glu	Val	Cys	Thr	Val	Glu	Thr	Pro	Gly	Cys	Val	His	Val	Lys	
				150				155				160				
aca	gag	gat	cca	gat	tgt	gaa	tct	aaa	ccc	ttc	tcc	ggg	gga	gtg	gag	703
Thr	Glu	Asp	Pro	Asp	Cys	Glu	Ser	Lys	Pro	Phe	Ser	Gly	Gly	Val	Glu	
				165				170				175				
ccg	atg	tat	tgt	ctg	gag	aat	ggg	gcg	gaa	gag	atg	aag	aga	ggg	gtt	751
Pro	Met	Tyr	Cys	Leu	Glu	Asn	Gly	Ala	Glu	Glu	Met	Lys	Arg	Gly	Val	
180				185						190			195			
aaa	gcg	gat	aag	cat	tgg	ctg	agc	gag	ttt	gaa	cat	aac	tat	tgg	agt	799
Lys	Ala	Asp	Lys	His	Trp	Leu	Ser	Glu	Phe	Glu	His	Asn	Tyr	Trp	Ser	
				200					205				210			
gat	att	ctg	aaa	gag	aaa	gag	aaa	cag	aag	gag	caa	ggg	att	gta	gaa	847
Asp	Ile	Leu	Lys	Glu	Lys	Glu	Lys	Gln	Lys	Glu	Gln	Gly	Ile	Val	Glu	
				215				220				225				
acc	tgt	cag	caa	caa	cag	cag	gat	tcg	cta	tct	gtt	gca	gac	tat	ggg	895
Thr	Cys	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Asp	Ser	Leu	Ser	Val	Ala	Asp	Tyr	Gly	
				230				235				240				
tgg	ccc	aat	gat	gtg	gat	cag	agt	cac	ttg	gat	tct	tca	gac	atg	ttt	943
Trp	Pro	Asn	Asp	Val	Asp	Gln	Ser	His	Leu	Asp	Ser	Ser	Asp	Met	Phe	
				245				250				255				
gat	gtc	gat	gag	ctt	cta	cgt	gac	cta	aat	ggc	gac	gat	gtg	ttt	gca	991
Asp	Val	Asp	Glu	Leu	Leu	Arg	Asp	Leu	Asn	Gly	Asp	Asp	Val	Phe	Ala	
260				265						270			275			
ggc	tta	aat	cag	gac	cgg	tac	ccg	ggg	aac	agt	gtt	gcc	aac	ggg	tca	1039
Gly	Leu	Asn	Gln	Asp	Arg	Tyr	Pro	Gly	Asn	Ser	Val	Ala	Asn	Gly	Ser	
				280					285				290			
tac	agg	ccc	gag	agt	caa	caa	agt	ggg	ttt	gat	ccg	cta	caa	agc	ctc	1087
Tyr	Arg	Pro	Glu	Ser	Gln	Gln	Ser	Gly	Phe	Asp	Pro	Leu	Gln	Ser	Leu	
				295					300				305			

```

aac tac gga ata cct ccg ttt cag ctc gag gga aag gat ggt aat gga 1135
Asn Tyr Gly Ile Pro Pro Phe Gln Leu Glu Gly Lys Asp Gly Asn Gly
      310              315              320
ttc ttc gac gac ttg agt tac ttg gat ctg gag aac taaacaaaac 1181
Phe Phe Asp Asp Leu Ser Tyr Leu Asp Leu Glu Asn
      325              330              335
aataatgaagc tttttggatt tgaatttgc cttaatccca caacgactgt tgattctcta 1241
tccgagtttt agtgalatag agaactacag aacacgtttt ttcttgttat aaaggigaac 1301
tgtatataac gaaacagtga tatgacaata gagaagacaa ctatagtttg ttagtctgct 1361
tctcttaagt tgttctttag atatgtttta tgtttttaa caacaggaat gaataataca 1421
cacttgtaaa aaaaaa 1437

```

<210> 4
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 4

```

Met Ala Val Tyr Asp Gln Ser Gly Asp Arg Asn Arg Thr Gln Ile Asp
  1              5              10              15
Thr Ser Arg Lys Arg Lys Ser Arg Ser Arg Gly Asp Gly Thr Thr Val
      20              25              30
Ala Glu Arg Leu Lys Arg Trp Lys Glu Tyr Asn Glu Thr Val Glu Glu
      35              40              45
Val Ser Thr Lys Lys Arg Lys Val Pro Ala Lys Gly Ser Lys Lys Gly
      50              55              60
Cys Met Lys Gly Lys Gly Gly Pro Glu Asn Ser Arg Cys Ser Phe Arg
      65              70              75              80
Gly Val Arg Gln Arg Ile Trp Gly Lys Trp Val Ala Glu Ile Arg Glu
      85              90              95
Pro Asn Arg Gly Ser Arg Leu Trp Leu Gly Thr Phe Pro Thr Ala Gln
      100             105             110
Glu Ala Ala Ser Ala Tyr Asp Glu Ala Ala Lys Ala Met Tyr Gly Pro
      115             120             125
Leu Ala Arg Leu Asn Phe Pro Arg Ser Asp Ala Ser Glu Val Thr Ser
      130             135             140
Thr Ser Ser Gln Ser Glu Val Cys Thr Val Glu Thr Pro Gly Cys Val
      145             150             155             160
His Val Lys Thr Glu Asp Pro Asp Cys Glu Ser Lys Pro Phe Ser Gly
      165             170             175
Gly Val Glu Pro Met Tyr Cys Leu Glu Asn Gly Ala Glu Glu Met Lys
      180             185             190
Arg Gly Val Lys Ala Asp Lys His Trp Leu Ser Glu Phe Glu His Asn
      195             200             205
Tyr Trp Ser Asp Ile Leu Lys Glu Lys Glu Lys Gln Lys Glu Gln Gly
      210             215             220
Ile Val Glu Thr Cys Gln Gln Gln Gln Gln Asp Ser Leu Ser Val Ala
      225             230             235             240
Asp Tyr Gly Trp Pro Asn Asp Val Asp Gln Ser His Leu Asp Ser Ser
      245             250             255

```

Asp	Met	Phe	Asp	Val	Asp	Glu	Leu	Leu	Arg	Asp	Leu	Asn	Gly	Asp	Asp
			260					265					270		
Val	Phe	Ala	Gly	Leu	Asn	Gln	Asp	Arg	Tyr	Pro	Gly	Asn	Ser	Val	Ala
			275				280					285			
Asn	Gly	Ser	Tyr	Arg	Pro	Glu	Ser	Gln	Gln	Ser	Gly	Phe	Asp	Pro	Leu
		290				295					300				
Gln	Ser	Leu	Asn	Tyr	Gly	Ile	Pro	Pro	Phe	Gln	Leu	Glu	Gly	Lys	Asp
305					310				315					320	
Gly	Asn	Gly	Phe	Phe	Asp	Asp	Leu	Ser	Tyr	Leu	Asp	Leu	Glu	Asn	
			325					330					335		

<210> 5
 <211> 937
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<220>
 <221> CDS
 <222> (164).. (802)

<400> 5
 cttgaaaaag aatctacctg aaaagaaaaa aaagagagag agatataaat agctttacca 60
 agacagatat actatctttt attaatccaa aaagactgag aactctagta actacgtact 120
 acttaaacct tatccagtgt cttgaaacag agtactctga tca atg aac tca ttt 175
 Met Asn Ser Phe
 1
 tca gct ttt tct gaa atg ttt ggc tcc gat tac gag cct caa ggc gga 223
 Ser Ala Phe Ser Glu Met Phe Gly Ser Asp Tyr Glu Pro Gln Gly Gly
 5 10 15 20
 gat tat tgt ccg acg ttg gcc acg agt tgt ccg aag aaa ccg gcg ggc 271
 Asp Tyr Cys Pro Thr Leu Ala Thr Ser Cys Pro Lys Lys Pro Ala Gly
 25 30 35
 cgt aag aag ttt cgt gag act cgt cac cca att tac aga gga gtt cgt 319
 Arg Lys Lys Phe Arg Glu Thr Arg His Pro Ile Tyr Arg Gly Val Arg
 40 45 50
 caa aga aac tcc ggt aag tgg gtt tct gaa gtg aga gag cca aac aag 367
 Gln Arg Asn Ser Gly Lys Trp Val Ser Glu Val Arg Glu Pro Asn Lys
 55 60 65
 aaa acc agg att tgg ctc ggg act ttc caa acc gct gag atg gca gct 415
 Lys Thr Arg Ile Trp Leu Gly Thr Phe Gln Thr Ala Glu Met Ala Ala
 70 75 80
 cgt gct cac gac gtc gct gca tta gcc ctc cgt ggc cga tca gca tgt 463
 Arg Ala His Asp Val Ala Ala Leu Ala Leu Arg Gly Arg Ser Ala Cys
 85 90 95 100
 ctc aac ttc gct gac tcg gct tgg cgg cta cga atc ccg gag tca aca 511
 Leu Asn Phe Ala Asp Ser Ala Trp Arg Leu Arg Ile Pro Glu Ser Thr
 105 110 115
 tgc gcc aag gat atc caa aaa gcg gct gct gaa gcg gcg ttg gct ttt 559
 Cys Ala Lys Asp Ile Gln Lys Ala Ala Ala Glu Ala Ala Leu Ala Phe
 120 125 130

```

caa gat gag acg tgt gat acg acg acc acg aat cat ggc ctg gac atg 607
Gln Asp Glu Thr Cys Asp Thr Thr Thr Thr Asn His Gly Leu Asp Met
      135              140              145
gag gag acg atg gtg gaa gct att tat aca ccg gaa cag agc gaa ggt 655
Glu Glu Thr Met Val Glu Ala Ile Tyr Thr Pro Glu Gln Ser Glu Gly
      150              155              160
gcg ttt tat atg gat gag gag aca atg ttt ggg atg ccg act ttg ttg 703
Ala Phe Tyr Met Asp Glu Glu Thr Met Phe Gly Met Pro Thr Leu Leu
      165              170              175              180
gat aat atg gct gaa ggc atg ctt tta ccg ccg ccg tct gtt caa tgg 751
Asp Asn Met Ala Glu Gly Met Leu Leu Pro Pro Pro Ser Val Gln Trp
      185              190              195
aat cat aat tat gac ggc gaa gga gat ggt gac gtg tcg ctt tgg agt 799
Asn His Asn Tyr Asp Gly Glu Gly Asp Gly Asp Val Ser Leu Trp Ser
      200              205              210
tac taatattcga tagtcgtttc catitttgta ciatagtttg aaaatattct 852
Tyr
agttccitttt tttagaatgg ttccttcatt ttattttatt ttattgttgt agaaacgagt 912
ggaaaataat tcaatacaaa aaaaa 937

```

<210> 6

<211> 213

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 6

```

Met Asn Ser Phe Ser Ala Phe Ser Glu Met Phe Gly Ser Asp Tyr Glu
  1              5              10              15
Pro Gln Gly Gly Asp Tyr Cys Pro Thr Leu Ala Thr Ser Cys Pro Lys
      20              25              30
Lys Pro Ala Gly Arg Lys Lys Phe Arg Glu Thr Arg His Pro Ile Tyr
      35              40              45
Arg Gly Val Arg Gln Arg Asn Ser Gly Lys Trp Val Ser Glu Val Arg
      50              55              60
Glu Pro Asn Lys Lys Thr Arg Ile Trp Leu Gly Thr Phe Gln Thr Ala
      65              70              75              80
Glu Met Ala Ala Arg Ala His Asp Val Ala Ala Leu Ala Leu Arg Gly
      85              90              95
Arg Ser Ala Cys Leu Asn Phe Ala Asp Ser Ala Trp Arg Leu Arg Ile
      100              105              110
Pro Glu Ser Thr Cys Ala Lys Asp Ile Gln Lys Ala Ala Ala Glu Ala
      115              120              125
Ala Leu Ala Phe Gln Asp Glu Thr Cys Asp Thr Thr Thr Asn His
      130              135              140
Gly Leu Asp Met Glu Glu Thr Met Val Glu Ala Ile Tyr Thr Pro Glu
      145              150              155              160
Gln Ser Glu Gly Ala Phe Tyr Met Asp Glu Glu Thr Met Phe Gly Met
      165              170              175
Pro Thr Leu Leu Asp Asn Met Ala Glu Gly Met Leu Leu Pro Pro Pro
      180              185              190

```

Ser Val Gln Trp Asn His Asn Tyr Asp Gly Glu Gly Asp Gly Asp Val
 195 200 205
 Ser Leu Trp Ser Tyr
 210

<210> 7
 <211> 944
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<220>
 <221> CDS
 <222> (135).. (782)

<400> 7
 cctgaattag aaaagaaaga tagatagaga aataaatatt ttaicataacc atacaaaaaa 60
 agacagagat ctctacttta ctctactctc ataaacctta tccagtttct tgaacagag 120
 tactcttctg atca atg aac tca ttt tct gcc ttt tct gaa atg ttt ggc 170
 Met Asn Ser Phe Ser Ala Phe Ser Glu Met Phe Gly
 1 5 10
 tcc gat tac gag tct ccg gtt tcc tca ggc ggt gat tac agt ccg aag 218
 Ser Asp Tyr Glu Ser Pro Val Ser Ser Gly Gly Asp Tyr Ser Pro Lys
 15 20 25
 ctt gcc acg agc tgc ccc aag aaa cca gcg gga agg aag aag ttt cgt 266
 Leu Ala Thr Ser Cys Pro Lys Lys Pro Ala Gly Arg Lys Lys Phe Arg
 30 35 40
 gag act cgt cac cca att tac aga gga gtt cgt caa aga aac tcc ggt 314
 Glu Thr Arg His Pro Ile Tyr Arg Gly Val Arg Gln Arg Asn Ser Gly
 45 50 55 60
 aag tgg gtg tgt gag ttg aga gag cca aac aag aaa acg agg att tgg 362
 Lys Trp Val Cys Glu Leu Arg Glu Pro Asn Lys Lys Thr Arg Ile Trp
 65 70 75
 ctc ggg act ttc caa acc gct gag atg gca gct cgt gct cac gac gtc 410
 Leu Gly Thr Phe Gln Thr Ala Glu Met Ala Ala Arg Ala His Asp Val
 80 85 90
 gcc gcc ata gct ctc cgt ggc aga tct gcc tgt ctc aat ttc gct gac 458
 Ala Ala Ile Ala Leu Arg Gly Arg Ser Ala Cys Leu Asn Phe Ala Asp
 95 100 105
 tgg gct tgg cgg cta cga atc ccg gaa tca acc tgt gcc aag gaa atc 506
 Ser Ala Trp Arg Leu Arg Ile Pro Glu Ser Thr Cys Ala Lys Glu Ile
 110 115 120
 caa aag gcg gcg gct gaa gcc gcg ttg aat ttt caa gat gag atg tgt 554
 Gln Lys Ala Ala Ala Glu Ala Ala Leu Asn Phe Gln Asp Glu Met Cys
 125 130 135 140
 cat atg acg acg gat gct cat ggt ctt gac atg gag gag acc ttg gtg 602
 His Met Thr Thr Asp Ala His Gly Leu Asp Met Glu Glu Thr Leu Val
 145 150 155
 gag gct att tat acg ccg gaa cag agc caa gat gcg ttt tat atg gat 650
 Glu Ala Ile Tyr Thr Pro Glu Gln Ser Gln Asp Ala Phe Tyr Met Asp
 160 165 170

gaa gag gcg atg ttg ggg atg tct agt ttg ttg gat aac atg gcc gaa 698
 Glu Glu Ala Met Leu Gly Met Ser Ser Leu Leu Asp Asn Met Ala Glu
 175 180 185
 ggg atg ctt tta ccg tcg ccg tcg gtt caa tgg aac tat aat ttt gat 746
 Gly Met Leu Leu Pro Ser Pro Ser Val Gln Trp Asn Tyr Asn Phe Asp
 190 195 200
 gtc gag gga gat gat gac gtg tcc tta tgg agc tat taaaattcga 792
 Val Glu Gly Asp Asp Asp Val Ser Leu Trp Ser Tyr
 205 210 215
 tttttatttc catttttggg attatagctt tttatacatt tgatcctttt ttagaatgga 852
 tcttcttctt tttttgggtg tgagaaacga atgtaaatgg taaaagtigt tgtcaaatgc 912
 aaatgttttt gagtcagaa tatataatct tt 944

<210> 8

<211> 216

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 8

Met Asn Ser Phe Ser Ala Phe Ser Glu Met Phe Gly Ser Asp Tyr Glu
 1 5 10 15
 Ser Pro Val Ser Ser Gly Gly Asp Tyr Ser Pro Lys Leu Ala Thr Ser
 20 25 30
 Cys Pro Lys Lys Pro Ala Gly Arg Lys Lys Phe Arg Glu Thr Arg His
 35 40 45
 Pro Ile Tyr Arg Gly Val Arg Gln Arg Asn Ser Gly Lys Trp Val Cys
 50 55 60
 Glu Leu Arg Glu Pro Asn Lys Lys Thr Arg Ile Trp Leu Gly Thr Phe
 65 70 75 80
 Gln Thr Ala Glu Met Ala Ala Arg Ala His Asp Val Ala Ala Ile Ala
 85 90 95
 Leu Arg Gly Arg Ser Ala Cys Leu Asn Phe Ala Asp Ser Ala Trp Arg
 100 105 110
 Leu Arg Ile Pro Glu Ser Thr Cys Ala Lys Glu Ile Gln Lys Ala Ala
 115 120 125
 Ala Glu Ala Ala Leu Asn Phe Gln Asp Glu Met Cys His Met Thr Thr
 130 135 140
 Asp Ala His Gly Leu Asp Met Glu Glu Thr Leu Val Glu Ala Ile Tyr
 145 150 155 160
 Thr Pro Glu Gln Ser Gln Asp Ala Phe Tyr Met Asp Glu Glu Ala Met
 165 170 175
 Leu Gly Met Ser Ser Leu Leu Asp Asn Met Ala Glu Gly Met Leu Leu
 180 185 190
 Pro Ser Pro Ser Val Gln Trp Asn Tyr Asn Phe Asp Val Glu Gly Asp
 195 200 205
 Asp Asp Val Ser Leu Trp Ser Tyr
 210 215

<210> 9

<211> 1513

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>

<221> CDS

<222> (183).. (1172)

<400> 9

```

gagacgctag aaagaacgcg aaagcttgcg aagaagattt gcttttgatc gacttaacac 60
gaacaacaaa caacatctgc gtgataaaga agagatitit gcctaaataa agaagagatt 120
cgactctaatt cctggagtta tcattcacga tagattictta gatlgcgact ataaagaaga 180
ag atg gct gta tat gaa caa acc gga acc gag cag ccg aag aaa agg 227
Met Ala Val Tyr Glu Gln Thr Gly Thr Glu Gln Pro Lys Lys Arg
      1           5           10           15
aaa tct agg gct cga gca ggt ggt tta acg gtg gct gat agg cta aag 275
Lys Ser Arg Ala Arg Ala Gly Gly Leu Thr Val Ala Asp Arg Leu Lys
      20           25           30
aag tgg aaa gag tac aac gag att gtt gaa gct tcg gct gtt aaa gaa 323
Lys Trp Lys Glu Tyr Asn Glu Ile Val Glu Ala Ser Ala Val Lys Glu
      35           40           45
gga gag aaa ccg aaa cgc aaa gtt cct gcg aaa ggg tcg aag aaa ggt 371
Gly Glu Lys Pro Lys Arg Lys Val Pro Ala Lys Gly Ser Lys Lys Gly
      50           55           60
tgt atg aag ggt aaa gga gga cca gat aat tct cac tgt agt ttt aga 419
Cys Met Lys Gly Lys Gly Gly Pro Asp Asn Ser His Cys Ser Phe Arg
      65           70           75
gga gtt aga caa agg att tgg ggt aaa tgg gtt gca gag att cga gaa 467
Gly Val Arg Gln Arg Ile Trp Gly Lys Trp Val Ala Glu Ile Arg Glu
      80           85           90           95
ccg aaa ata gga act aga ctt tgg ctt ggt act ttt cct acc gcg gaa 515
Pro Lys Ile Gly Thr Arg Leu Trp Leu Gly Thr Phe Pro Thr Ala Glu
      100          105          110
aaa gct gct tcc gct tat gat gaa gcg gct acc gct atg tac ggt tca 563
Lys Ala Ala Ser Ala Tyr Asp Glu Ala Ala Thr Ala Met Tyr Gly Ser
      115          120          125
ttg gct cgt ctt aac ttc cct cag tct gtt ggg tct gag ttt act agt 611
Leu Ala Arg Leu Asn Phe Pro Gln Ser Val Gly Ser Glu Phe Thr Ser
      130          135          140
acg tct agt caa tct gag gtg tgt acg gtt gaa aat aag gcg gtt gtt 659
Thr Ser Ser Gln Ser Glu Val Cys Thr Val Glu Asn Lys Ala Val Val
      145          150          155
tgt ggt gat gtt tgt gtg aag cat gaa gat act gat tgt gaa tct aat 707
Cys Gly Asp Val Cys Val Lys His Glu Asp Thr Asp Cys Glu Ser Asn
      160          165          170          175
cca ttt agt cag att tta gat gtt aga gaa gag tct tgt gga acc agg 755
Pro Phe Ser Gln Ile Leu Asp Val Arg Glu Glu Ser Cys Gly Thr Arg
      180          185          190
ccg gac agt tgc acg gtt gga cat caa gat atg aat tct tcg ctg aat 803
Pro Asp Ser Cys Thr Val Gly His Gln Asp Met Asn Ser Ser Leu Asn
      195          200          205

```

tac gat ttg ctg tta gag ttt gag cag cag tat tgg ggc caa gtt ttg 851
 Tyr Asp Leu Leu Leu Glu Phe Glu Gln Gln Tyr Trp Gly Gln Val Leu
 210 215 220
 cag gag aaa gag aaa ccg aag cag gaa gaa gag gag ata cag caa cag 899
 Gln Glu Lys Glu Lys Pro Lys Gln Glu Glu Glu Glu Ile Gln Gln Gln
 225 230 235
 caa cag gaa cag caa cag caa cag ctg caa ccg gat ttg ctt act gtt 947
 Gln Gln Glu Gln Gln Gln Gln Gln Leu Gln Pro Asp Leu Leu Thr Val
 240 245 250 255
 gca gat tac ggt tgg cct tgg tct aat gat att gta aat gat cag act 995
 Ala Asp Tyr Gly Trp Pro Trp Ser Asn Asp Ile Val Asn Asp Gln Thr
 260 265 270
 tct tgg gat cct aat gag tgc ttt gat att aat gaa ctc ctt gga gat 1043
 Ser Trp Asp Pro Asn Glu Cys Phe Asp Ile Asn Glu Leu Leu Gly Asp
 275 280 285
 ttg aat gaa cct ggt ccc cat cag agc caa gac caa aac cac gta aat 1091
 Leu Asn Glu Pro Gly Pro His Gln Ser Gln Asp Gln Asn His Val Asn
 290 295 300
 tct ggt agt tat gat ttg cat ccg ctt cat ctc gag cca cac gat ggt 1139
 Ser Gly Ser Tyr Asp Leu His Pro Leu His Leu Glu Pro His Asp Gly
 305 310 315
 cac gag ttc aat ggt ttg agt tct ctg gat att tgagagtctt gaggcaatgg 1192
 His Glu Phe Asn Gly Leu Ser Ser Leu Asp Ile
 320 325 330
 tcctacaaga ctacaacata atctttggat tgatcatagg agaaacaaga aataggtgtt 1252
 aatgatctga ttacacaatga aaaaaatatit aataactcta tagtttttgt tctttccttg 1312
 gatcatgaac tgttgcttct catctattga gttaatatag cgaatagcag agtttctctc 1372
 tttcttctct ttgtagaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaayh sakmabgcar 1432
 srcsdvsnaa nntrnatnar sarchentrr agretrasen csrscaswash tskbabarak 1492
 aantamaysa kmasrngnga c 1513

<210> 10

<211> 330

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 10

Met Ala Val Tyr Glu Gln Thr Gly Thr Glu Gln Pro Lys Lys Arg Lys
 1 5 10 15
 Ser Arg Ala Arg Ala Gly Gly Leu Thr Val Ala Asp Arg Leu Lys Lys
 20 25 30
 Trp Lys Glu Tyr Asn Glu Ile Val Glu Ala Ser Ala Val Lys Glu Gly
 35 40 45
 Glu Lys Pro Lys Arg Lys Val Pro Ala Lys Gly Ser Lys Lys Gly Cys
 50 55 60
 Met Lys Gly Lys Gly Gly Pro Asp Asn Ser His Cys Ser Phe Arg Gly
 65 70 75 80
 Val Arg Gln Arg Ile Trp Gly Lys Trp Val Ala Glu Ile Arg Glu Pro
 85 90 95
 Lys Ile Gly Thr Arg Leu Trp Leu Gly Thr Phe Pro Thr Ala Glu Lys

100	105	110
Ala Ala Ser Ala Tyr Asp Glu	Ala Ala Thr Ala Met Tyr Gly Ser Leu	
115	120	125
Ala Arg Leu Asn Phe Pro Gln Ser Val Gly Ser Glu Phe Thr Ser Thr		
130	135	140
Ser Ser Gln Ser Glu Val Cys Thr Val Glu Asn Lys Ala Val Val Cys		
145	150	155
Gly Asp Val Cys Val Lys His Glu Asp Thr Asp Cys Glu Ser Asn Pro		
165	170	175
Phe Ser Gln Ile Leu Asp Val Arg Glu Glu Ser Cys Gly Thr Arg Pro		
180	185	190
Asp Ser Cys Thr Val Gly His Gln Asp Met Asn Ser Ser Leu Asn Tyr		
195	200	205
Asp Leu Leu Leu Glu Phe Glu Gln Gln Tyr Trp Gly Gln Val Leu Gln		
210	215	220
Glu Lys Glu Lys Pro Lys Gln Glu Glu Glu Ile Gln Gln Gln Gln		
225	230	235
Gln Glu Gln Gln Gln Gln Gln Leu Gln Pro Asp Leu Leu Thr Val Ala		
245	250	255
Asp Tyr Gly Trp Pro Trp Ser Asn Asp Ile Val Asn Asp Gln Thr Ser		
260	265	270
Trp Asp Pro Asn Glu Cys Phe Asp Ile Asn Glu Leu Leu Gly Asp Leu		
275	280	285
Asn Glu Pro Gly Pro His Gln Ser Gln Asp Gln Asn His Val Asn Ser		
290	295	300
Gly Ser Tyr Asp Leu His Pro Leu His Leu Glu Pro His Asp Gly His		
305	310	315
Glu Phe Asn Gly Leu Ser Ser Leu Asp Ile		
325	330	

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on the promoter region of rd29A gene and having HindIII site.

<400> 11

aagcttaagc ttacatcagt ttgaaagaaa

30

<210> 12

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on the promoter region of rd29A gene and having HindIII site.

<400> 12
aagcttaagc ttgctttttg gaactcatgt c 31

<210> 13
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Designed oligonucleotide based on DREB1A gene and having BamHI site.

<400> 13
aagcttaagc ttgccataga tgcaattcaa tc 32
<210> 14
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Designed oligonucleotide based on DREB1A gene and having BamHI site.

<400> 14
aagcttaagc ttttccaaag atttttttct.ttccaa 36

<210> 15
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Designed oligonucleotide based on the promoter region of rd29A gene and having HindIII site.

<400> 15
ggatccggat ccatgaactc attttcgtct 30

<210> 16
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Designed oligonucleotide based on the promoter region of rd29A gene and having HindIII site.

<400> 16

ggatccggat ccttaataac tcataacga ta

32

<210> 17

<211> 941

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 17

```

gccatagatg caattcaatc aaactgaaat ttctgcaaga atctcaaca cggagatctc 60
aaagtttgaa agaaaattta ttcttcgac tcaaaacaaa cttacgaaat ttagglagaa 120
cttatataca ttatatigta attttttgta acaaaatgtt ttattatta ttatagaatt 180
ttaciggtta aattaaaaat gaatagaaaa ggigaattaa gaggagagag gaggtaaaca 240
ttttcttcta tttttcata ttttcaggat aaattattgt aaaagtttac aagattcca 300
tttgactagt gtaaatgagg aatattctct agtaagatca ttatttcac tacttctttt 360
atcttctacc agtagaggaa taaacaatat ttagctcctt tgtaaataca aattaatttt 420
ccttcttgac atcattcaat ttaatttta cgtataaaat aaaagatcat acctattaga 480
acgaitaagg agaaatacaa ttcgaatgag aaggatgtgc cgtttgttat aataaacagc 540
cacacgacgt aaacgtaaaa tgaccacatg atgggccaat agacatggac cgactactaa 600
taatagtaag ttacatttta ggaatgaata aatacatac cgacatcagt ttgaaagaa 660
aagggaaaaa aagaaaaaat aaataaaaga tatactaccg acatgagttc caaaaagcaa 720
aaaaaaagat caagccgaca cagacacgag tagagagcaa aatgactttg acgtcacacc 780
acgaaaacag acgcttcata cgtgtccctt tatctctctc agtctctcta taaacttagt 840
gagaccctcc tctgttttac tcacaaatat gcaaactaga aaacaatcat caggaataaa 900
gggtttgatt acttctattg gaaagaaaaa aatcittgga a 941

```

<210> 18

<211> 71

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 18

```

cagtttgaaa gaaaaggga aaaaagaaaa aataaataaa agatatacta ccgacatgag 60
ttccaaaaag c 71

```

<210> 19

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide having a partially mutated sequence within the DRE region.

<400> 19

```

cagtttgaaa gaaaaggga aaaaagaaaa aataaataaa agatataatt tcgacatgag 60
ttccaaaaag c 71

```

<210> 20

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide having a partially mutated sequence within the DRE region.

<400> 20

cagtttgaaa gaaaaggga aaaaagaaaa aataaataaa agatatacta cttttatgag 60
 ttccaaaaag c 71

<210> 21

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide having a partially mutated sequence within the DRE region.

<400> 21

cagtttgaaa gaaaaggga aaaaagaaaa aataaataaa agatatacta ccgacaaaag 60
 ttccaaaaag c 71

<210> 22

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide having a partially mutated sequence outside the DRE region.

<400> 22

cagtttgaaa gaaaaggga aaaaagaaaa aataaataaa agatatacta ccgacatgat 60
 caacaaaaag c 71

<210> 23

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide having a partially mutated sequence outside the DRE region.

<400> 23

cagtttgaaa gaaaaggga aaaaagaaaa aataaataaa agatatacta ccgacatgag 60
 ttcggttaag c 71

【0098】

【配列表フリーテキスト】

【0099】

【配列番号11】 rd29A遺伝子のプロモーター領域に基づいて設計した、HindIII部位を有するオリゴヌクレオチド。

【0100】

【配列番号12】 rd29A遺伝子のプロモーター領域に基づいて設計した、HindIII部位を有するオリゴヌクレオチド。

【0101】

【配列番号13】 DREB1A遺伝子のプロモーター領域に基づいて設計した、BamHI部位を有するオリゴヌクレオチド。

【0102】

【配列番号14】 DREB1A遺伝子のプロモーター領域に基づいて設計した、BamHI部位を有するオリゴヌクレオチド。

【0103】

【配列番号15】 rd29A遺伝子のプロモーター領域に基づいて設計した、HindIII部位を有するオリゴヌクレオチド。

【0104】

【配列番号16】 rd29A遺伝子のプロモーター領域に基づいて設計した、HindIII部位を有するオリゴヌクレオチド。

【0105】

【配列番号19】 DRE領域内の配列を一部変異させたオリゴヌクレオチド。

【0106】

【配列番号20】 DRE領域内の配列を一部変異させたオリゴヌクレオチド。

【0107】

【配列番号21】 DRE領域内の配列を一部変異させたオリゴヌクレオチド。

【0108】

【配列番号22】 DRE領域外の配列を一部変異させたオリゴヌクレオチド。

【0109】

【配列番号23】 DRE領域外の配列を一部変異させたオリゴヌクレオチド。

【図面の簡単な説明】

【図1】 DREB遺伝子のスクリーニング方法の原理を示す図である。

【図2】 DREB1Aタンパク質及びDREB2Aタンパク質のDREへの結合特性に関するゲルシフトアッセイに用いたプローブの構造及び該アッセイの結果を示す電気泳動写真である。

【図3】 DREB1Aタンパク質及びDREB2Aタンパク質の転写活性化能を示す図である。

【図4】 CAMV35Sプロモーターを含む植物導入用組換えプラスミドの構造を示す図である。

【図5】 DREB1A遺伝子導入植物におけるストレス負荷時の各遺伝子の転写レベルを示す電気泳動写真である。

【図6】 DREB1A遺伝子導入植物の凍結ストレス又は乾燥ストレスを与えた場合の植物の生育を示した写真である(生物の形態)。

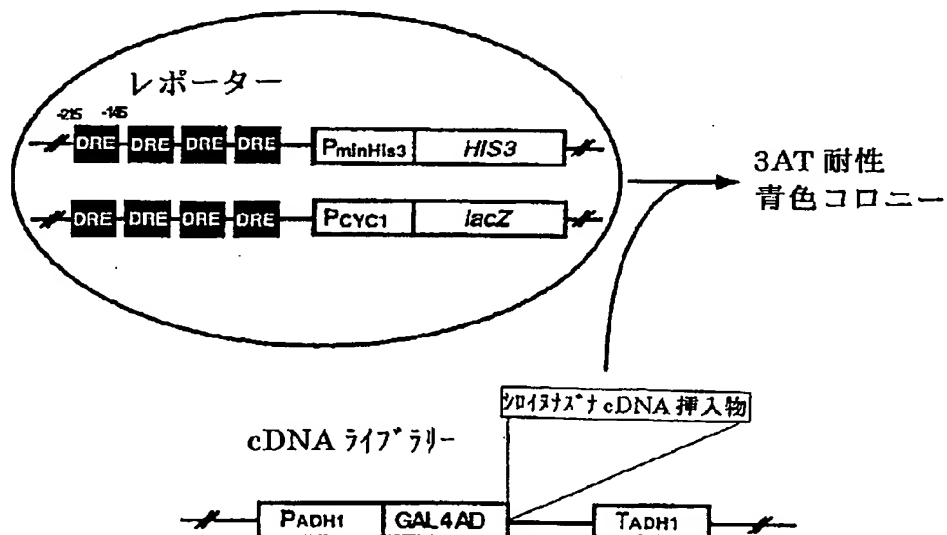
【図7】 rd29A遺伝子プロモーターを含む植物導入用組換えプラスミドの構造を示す図である。

【図8】 pBI35S:DREB1Aを導入したトランスジェニック植物の生育を示す写真である(生物の形態)。

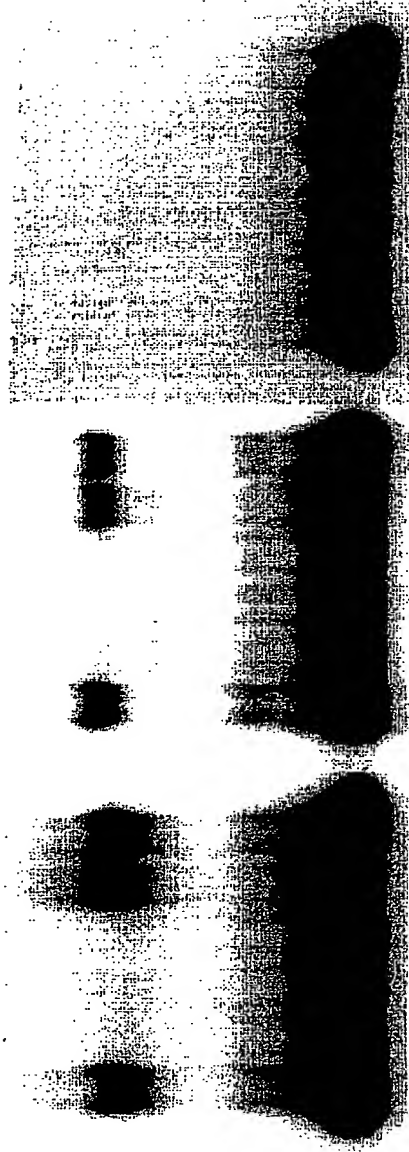
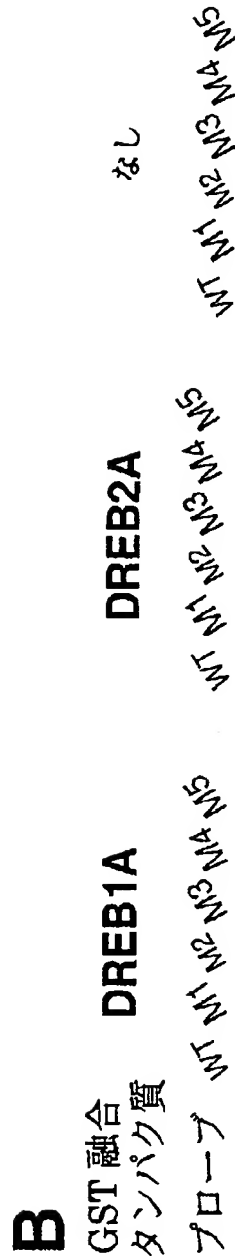
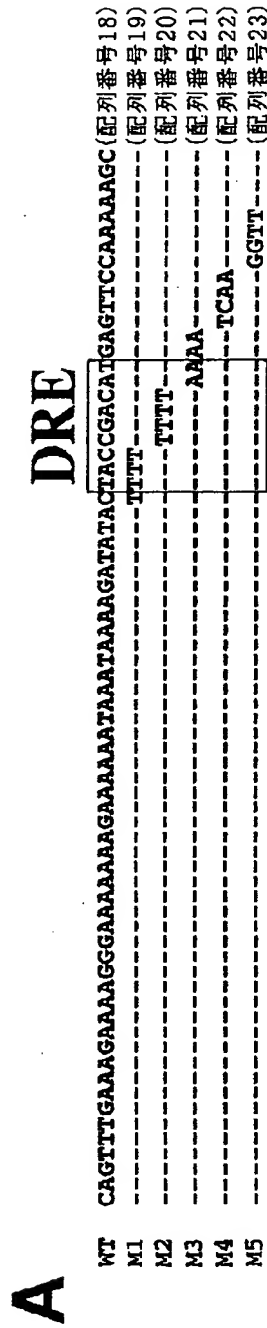
【図9】 pBI29AP:DREB1Aを導入したトランスジェニック植物の生育を示す写真である(生物の形態)。

【図10】 ストレス負荷後のトランスジェニック植物の生存を示す写真である(生物の形態)。

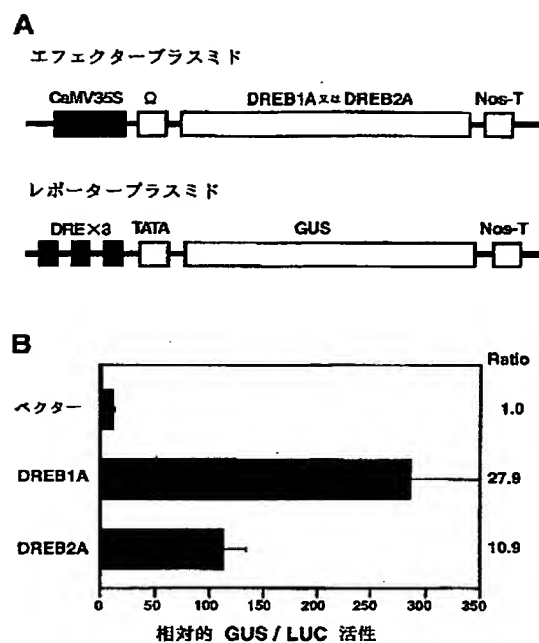
【図1】



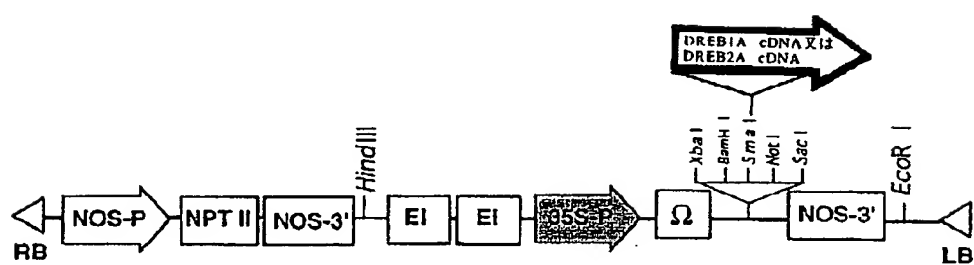
【図2】



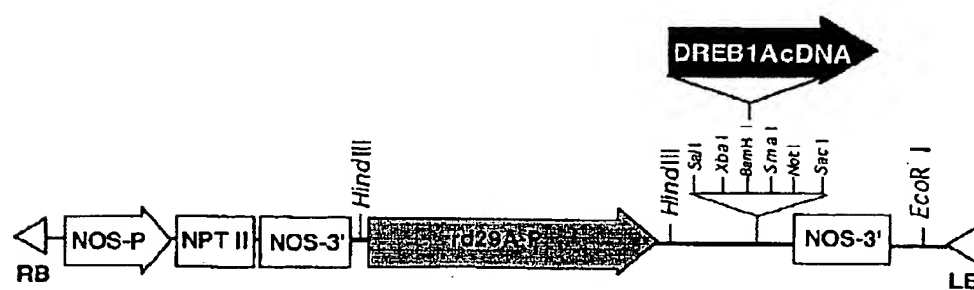
【図 3】



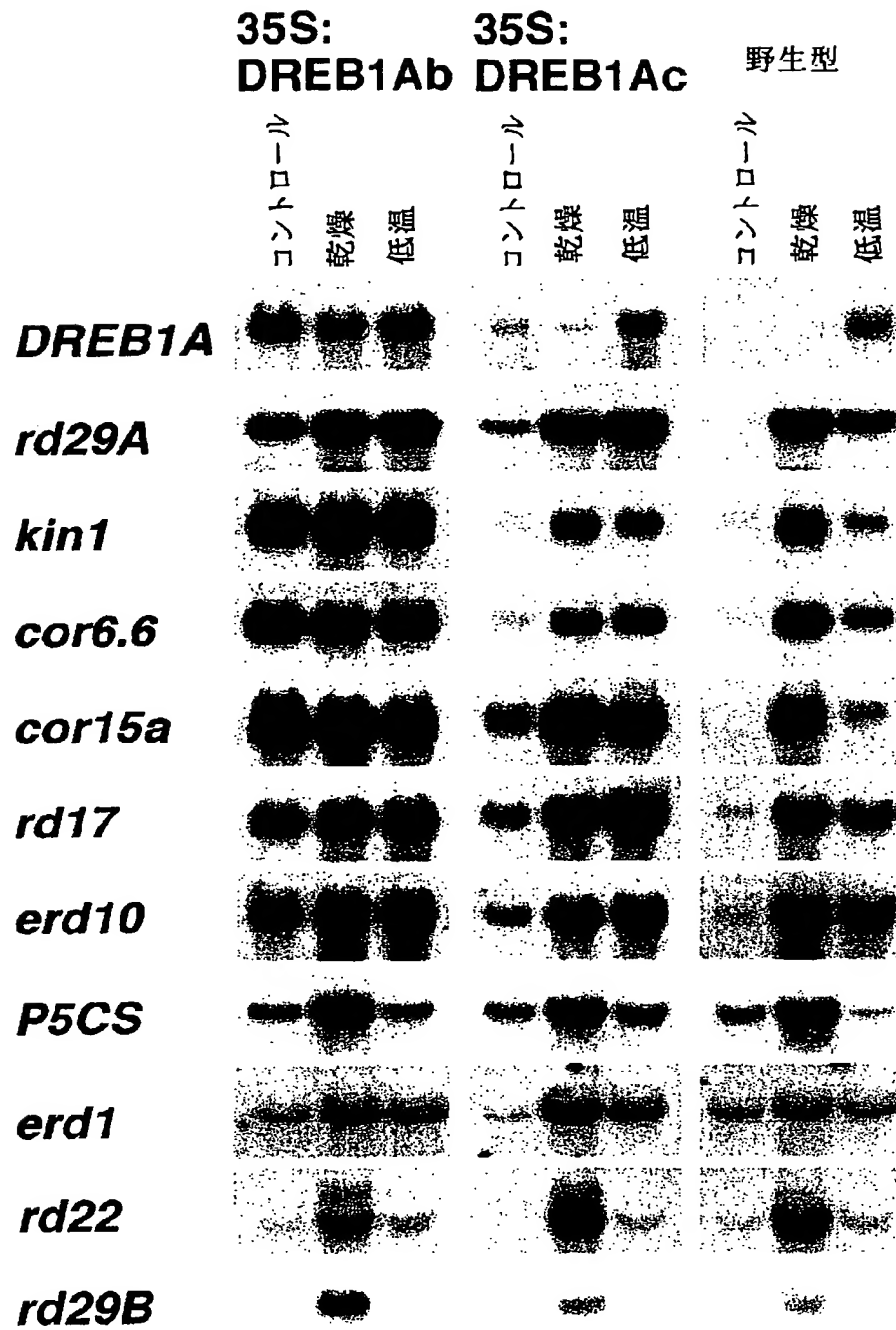
【図 4】



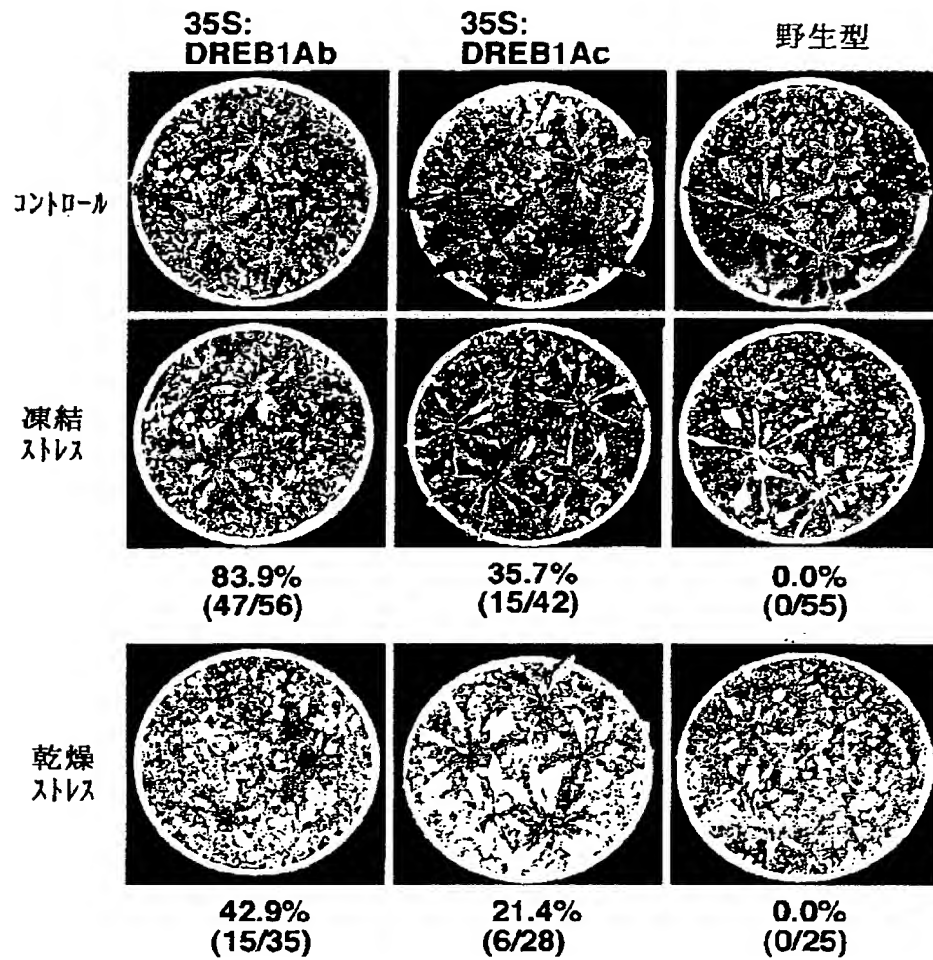
【図 7】



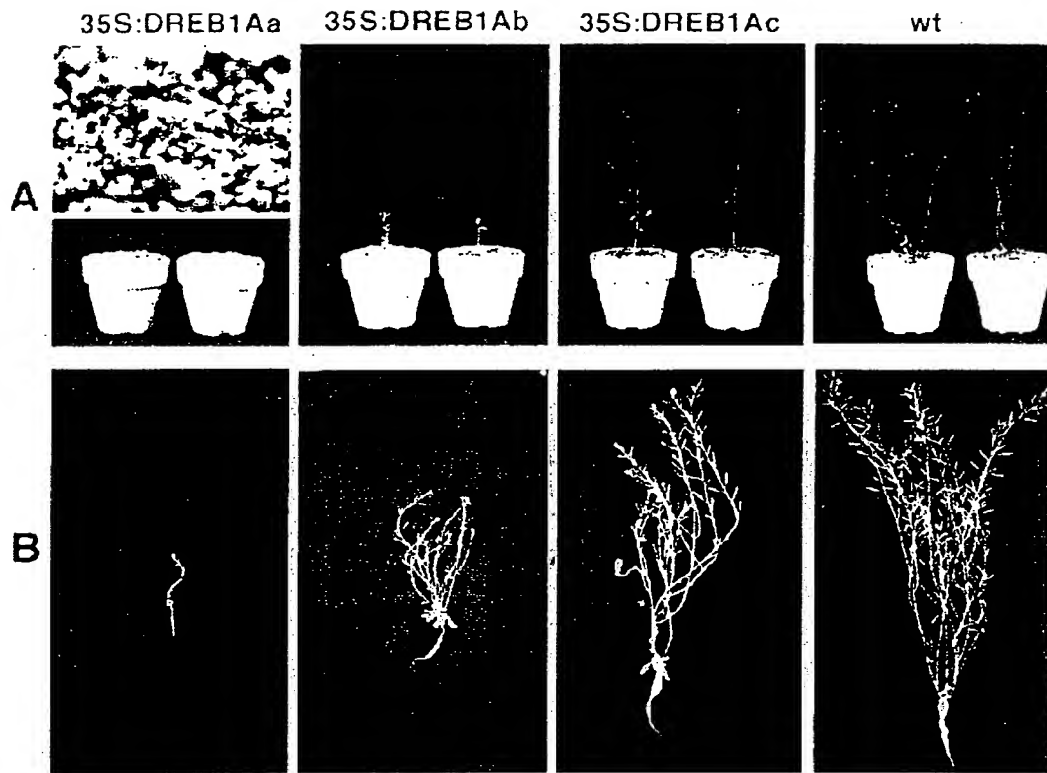
【図5】



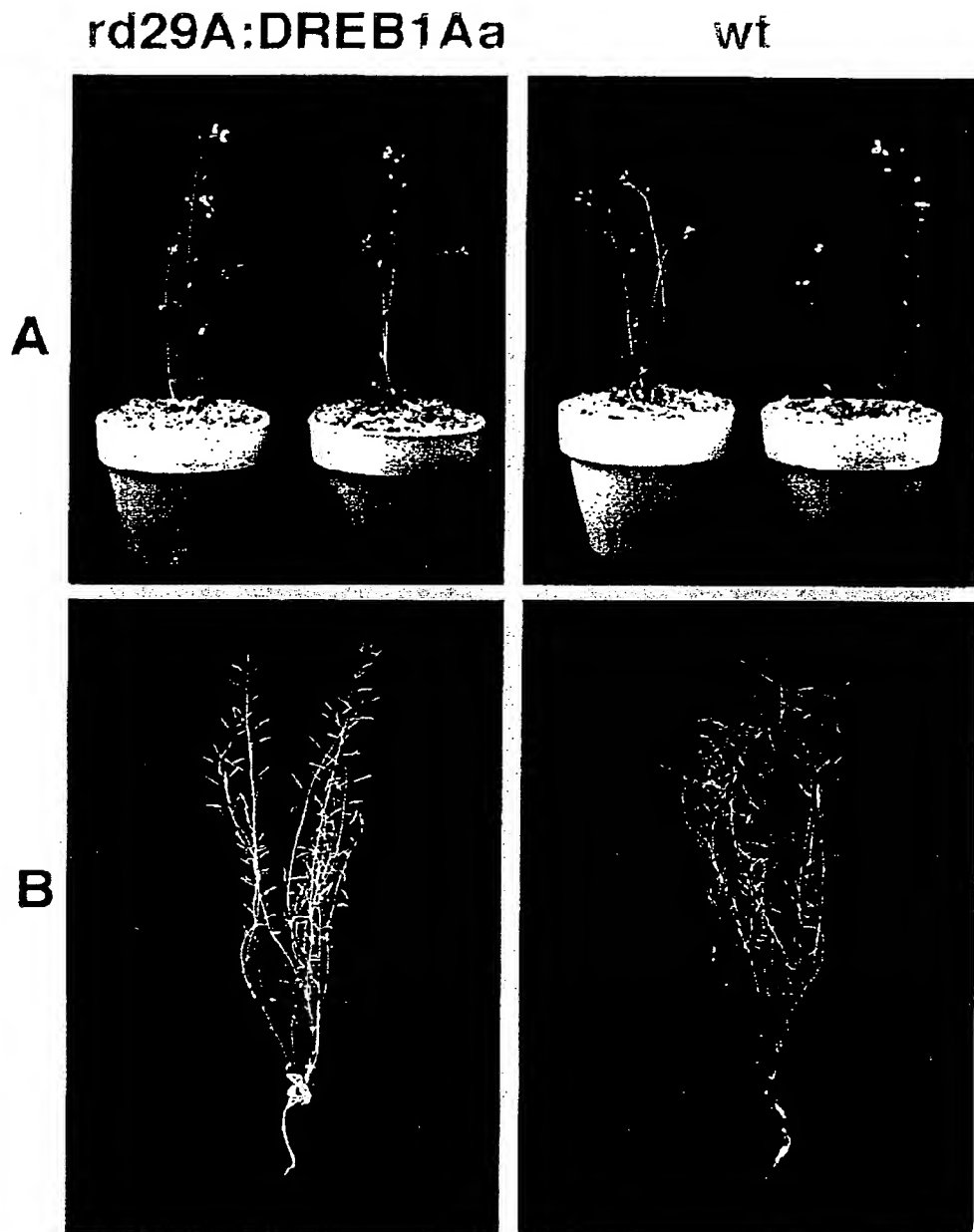
【図6】



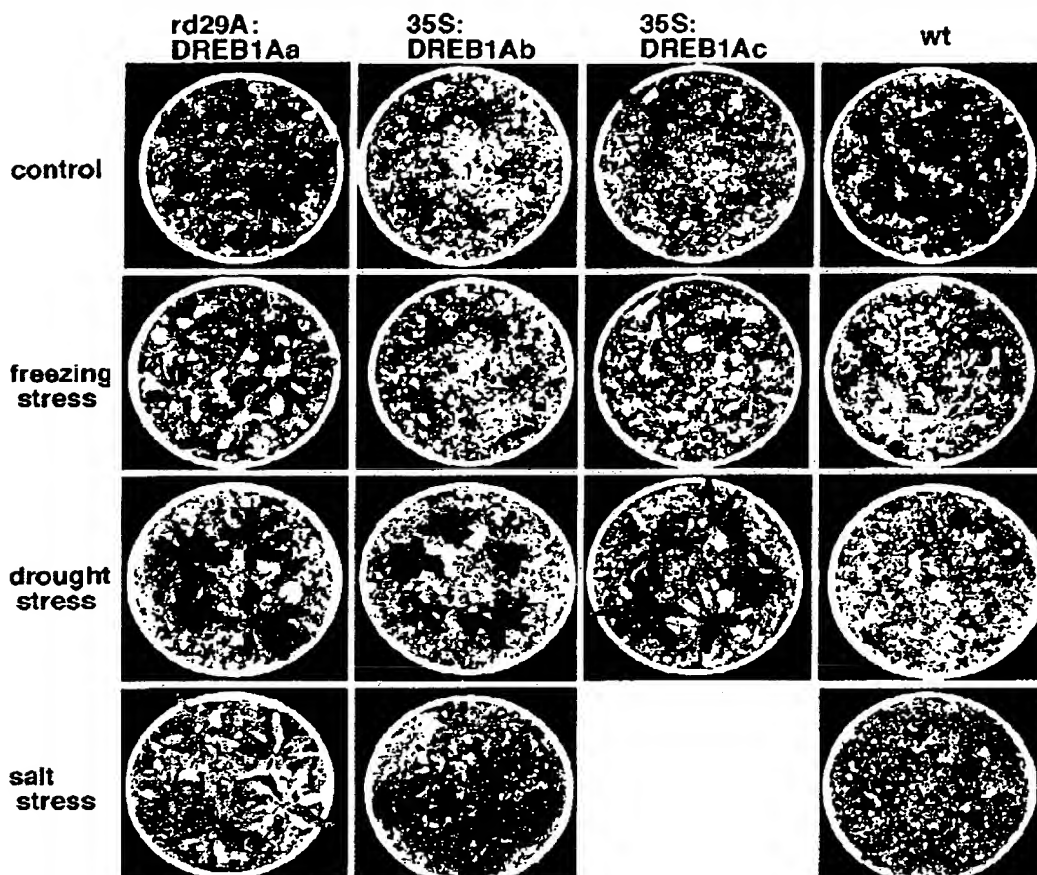
【図8】



【図9】



【図 10】



【手続補正書】

【提出日】平成11年10月12日（1999. 10. 12）

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】ストレス応答性プロモーターに、転写因子をコードする遺伝子が連結されたDNAが導入されたトランスジェニック植物であって、当該転写因子が、当該ストレス応答性プロモーターに結合し、且つ、当該転写因子をコードする遺伝子の転写を活性化することができるものであるトランスジェニック植物。

【請求項2】ストレス応答性プロモーターが乾燥ストレス応答性エレメントを含むプロモーターである請求項1に記載のトランスジェニック植物。

【請求項3】ストレス応答性プロモーターがrd29A遺伝

子プロモーターである請求項1に記載のトランスジェニック植物。

【請求項4】転写因子がDREB1タンパク質である請求項1に記載のトランスジェニック植物。

【請求項5】ストレス応答性プロモーターに、転写因子をコードする遺伝子が連結されたDNAを導入することを特徴とするトランスジェニック植物の作成方法であって、当該転写因子が、当該ストレス応答性プロモーターに結合し、且つ、当該転写因子をコードする遺伝子の転写を活性化することができるものであるトランスジェニック植物の作成方法。

【請求項6】ストレス応答性プロモーターが乾燥ストレス応答性エレメントを含むプロモーターである請求項5に記載のトランスジェニック植物の作成方法。

【請求項7】ストレス応答性プロモーターがrd29A遺伝子プロモーターである請求項5に記載のトランスジェニック植物の作成方法。

【請求項8】転写因子がDREB1タンパク質である請求項

【書類名】	受託番号変更届	工業技術研究所	
【整理番号】	P98-0392	【新受託番号】	FERM BP-6654
【提出日】	平成11年2月22日(1999.2.22)	【旧寄託機関の名称】	通商産業省工業技術院生命工学
【旧寄託機関の名称】	通商産業省工業技術院生命工学	工業技術研究所	
工業技術研究所		【旧受託番号】	FERM P-16937
【旧受託番号】	FERM P-16936	【新寄託機関の名称】	通商産業省工業技術院生命工学
【新寄託機関の名称】	通商産業省工業技術院生命工学	工業技術研究所	
		【新受託番号】	FERM BP-6655

フロントページの続き

Fターム(参考) 2B030 AA02 AB03 AD04 CA06 CA17
CA19 CB02 CD03 CD07 CD10
CD13 CD17 CD21
4B024 AA08 BA80 CA04 DA01 EA04
FA01 FA02 FA10 GA11 HA01
4H045 AA10 AA30 BA10 CA30 EA05
EA60 FA72 FA74